

TARTU ÜLIKOOL
BOTAANIKA JA ÖKOLOOGIA INSTITUUT
TAIMEÖKOLOOGIA ÕPPETOOL

Kadi Türk

METSASAMBLIKE SEISUNDI HINDAMISE MEETODID

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Ph.D. Piret Lõhmus

TARTU 2006

SISUKORD

1. SISSEJUHATUS	3
2. TALLUSE MORFOLOOGIAL JA ANATOOMIAL PÕHINEVAD MEETODID.....	8
2.1. Talluse morfoloogiliste tunnuste vaatlemine.....	8
2.1.1. Samblike morfoloogia ja selle mõjutajad	8
2.1.2. Talluse morfoloogiliste anomaaliate vaatlemine	9
2.1.3. Hinnang meetodile	10
2.2. Paljunemisstruktuuride ohtruse hindamine	11
2.2.1. Samblike paljunemisstruktuurid ja nende mõjutajad	11
2.2.2. Apoteetsiumite ja soreedide ohtruse hindamine	12
2.2.3. Hinnang meetoditele.....	12
2.3. Talluse anatoomiliste tunnuste vaatlemine.....	13
2.3.1. Talluse siseehitus	13
2.3.2. Valgusmikroskoobiga vaadeldavad tunnused.....	13
2.3.3. Fluorestsentsmikroskoobiga vaadeldavad tunnused	15
2.3.4. Elektronmikroskoobiga vaadeldavad tunnused	16
2.3.5. Hinnang meetoditele.....	17
3. TALLUSE KASVUL PÕHINEVAD MEETODID	18
3.1. Kasvu olemus.....	18
3.2. Üksiktalluse kasvu mõõtmine.....	19
3.2.1. Lineaarsed mõõtmised.....	20
3.2.2. Pindalalised mõõtmised.....	21
3.2.3. Biomassi mõõtmised	22
3.2.4. Hinnang meetoditele.....	23
3.3. Katvuse määramine.....	24
3.3.1. Hinnang meetodile	25
4. TALLUSE FÜSIOLOOGIAL PÕHINEVAD MEETODID	26
4.1. Energeetilise seisundi hindamine.....	26
4.1.1. Samblike fotosünteesi efektiivsus.....	26
4.1.2. Fotosünteesi intensiivsuse hindamine	28
4.1.2.1. Klorofüllil fluorestsentsil põhinev fotosünteesi intensiivsuse mõõtmine.....	28
4.1.2.2. Klorofüllil sisalduse määramine.....	30
4.1.2.3. Hinnang meetoditele	32
4.1.3. Hingamise intensiivsuse mõõtmine.....	32
4.1.3.1. Hinnang meetodile.....	33
4.1.4. Sümbiontide osakaalu hindamine	34
4.1.4.1. Hinnang meetodile	36
4.2. Stressiainete analüüs	37
4.2.1. Etüleeni tootmise mõõtmine	37
4.2.2. Superoksiidi dismutaasi ja glutatiooni reduktaasi aktiivsuse mõõtmine.....	38
4.2.3. Abstsessi sisalduse mõõtmine.....	39
4.2.4. Hinnang meetoditele.....	40
5. ARUTELU	41
KOKKUVÕTE.....	43
SUMMARY	44
TÄNUSÕNAD	45
KASUTATUD KIRJANDUS	46

1. SISSEJUHATUS

Samblik on sümbiontne organism, kes koosneb mükobiondist (seenest) ja fotobiondist. Fotobiondiks võib olla vetikas, tsüanobakter või mõlemad samaaegselt. Kuigi sümbiontidest moodustunud tallus näib olevat terviklik organism, loetakse seda siiski vaid seente toitumisstrateegiaks, mis on evolutsioonis tekkinud korduvalt. Sellest lähtuvalt paigutatakse samblikud taksonoomiliselt seente hulka (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Samblikud on tundlikud organismid. Ühelt poolt on põhjuseks nende sümbiontne olemus – tallus on keerukam kui üksikindiviid ega reageeri keskkonnale samavõrd vahetult (Fahselt, 1996). Sambliku kui terviku funktsioneerimiseks on vajalik partneritevaheline tasakaaluseisund (Kricke & Loppi, 2002) ja vaid ühe sümbiondi tugev kahjustus võib viia sambliku kui terviku surmani (Nimis *et al.*, 2002b). Samblike tundlikkus tuleneb ka nende ehitusest – kaitsva kutiikula puudumisest, mistõttu nad omastavad nii vett, toitaineid kui ka saasteaineid passiivselt kogu oma pinnaga ning ainete sisenemist ja väljumist kontrollib keskkond (Esseen & Renhorn, 1997; McCune, 2000). Muutus keskkonnatingimustes peegeldub samblike vitaalsuses¹ – nii koosluse mitmekesisuses kui ka indiviidi morfoloogias, anatoomias ning füsioloogias.

Samblike vitaalsuse ja elupaiga tingimuste seoste uurimisel kasutatakse põhiliselt kolme lähenemisviisi: (1) koosluste kirjeldamist, (2) füsioloogilise vastuse ja (3) morfoloogiliste või anatoomiliste muutuste uurimist (Gries, 1996). Samblikukoosluse ja keskkonnaparametrite seoste selgitamisel on informatsiooni allikas liik ja selle ohtrus. Füsioloogiliste ja morfoloogiliste-anatoomiliste muutuste uurimisel on aluseks isend, mistõttu mõju hindamise skaala on oluliselt täpsem kui koosluste uurimisel. Järgnevas töös keskendutaksegi morfoloogial, anatoomial ja füsioloogial põhinevatele uurimisviisidele, sest need on objektiivsemad, kasutavad moodsamaid vahendeid ega ole ainult keskkonnaseisundi hindamise teenistuses.

Talluse seisundi² määramist rakendatakse looduskaitsebioloogias, füsioloogilistes uuringutes ja bioindikatsioonis. Looduskaitsebioloogilistes töodes mõõdetakse samblikukoosluse ja liikide vitaalsuse seoseid inim mõjust tulenevate faktoritega, et paremini säilitada bioloogilist mitmekesisust (Richardson & Cameron, 2004). Samblike liigirikkust säilitavate

¹ Vitaalsus, elujõulisus – populatsiooni või isendi seisundi iseloomustus, mis väljendab selle suhet keskkonnaga, konkurentsivõimet ja kohanemist (Masing, 1992)

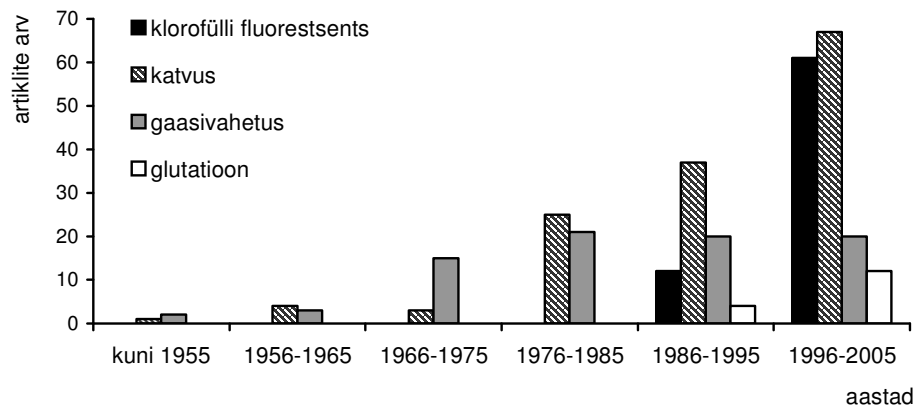
² Seisund e konditsioon – populatsiooni või isendi olukord koosluses, väljendatuna vitaalsuse – viljakuse, toitumuse, kahjustumuse jm hinnangutena (Masing, 1992)

majandamisstrateegiate väljatöötamiseks on põhjalikult uuritud metsaraie mõju liikide elujõulisusele, sealhulgas erinevate raieviiside ja servaepekti mõju (Renhorn, 1997; Renhorn *et al.*, 1997; Esseen & Renhorn, 1998; Cameron, 2002; Hilmo & Holien, 2002; Rheault *et al.*, 2003), samuti raieviiside ja õhusaaste koostoimet (Richardson & Cameron, 2004) ning metsastruktuuri mõju paljunemisedukusele (Johansson & Ehrlen, 2003). Talluse seisundit määratakse ka füsioloogilistes uuringutes, et selgitada erinevate keskkonnaparameetrite mõju samblikele. Talluse konditsiooni muutusi jälgides on uuritud fotoinhibitsiooni (Gauslaa & Solhaug, 2000), pH ja saasteainete kahjuliku mõju põhjusi (Beekley & Hoffmann, 1981; Gauslaa *et al.*, 1996; Bačkor & Fahselt, 2003) kuivamistolerantsi tagavaid mehhanisme ja reaktsioone (Chakir & Jensen, 1999; Minibayeva & Beckett, 2001; Kranner, 2002) ning sümbiontide toitumissuhteid (Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman *et al.*, 2003). Samblike konditsiooni määramine on üks bioindikatsiooni meetodeid elupaiga seisundi hindamisel. Indikaatororganismi kasutamist keskkonna kvaliteedi hindamisel peetakse efektiivsemaks meetodiks kui üksikparameetrite mõõtmist (Nimis *et al.*, 2002b), sest tehniline aparatuur limiteerib proovide ja uuritavate keskkonnamuutujate arvu ega näita bioloogiliselt olulist kumuleeruvat toimet (Bargagli & Mikhailova, 2002).

Millised omadused peaksid olema samblike vitaalsuse mõõtmiseks kasutataval meetodil? Hea meetod oleks tundlik, üheselt tõlgendatavate tulemustega, mittedestruktiivne, edasisteks analüüsideks kasutuskõlbliku proovimaterjaliga (Richardson, 1987) ja universaalne, st üheselt rakendatav sõltumata kasvuvormist ja liigist. Vastav indikaatortunnus, füsioloogiline, morfoloogiline või anatoomiline näitaja, millel meetod põhineb, peaks olema täpselt (st väikse mõõtmisveaga, vähese loodusliku varieeruvusega ja vastavuses keskkonnatingimuste muutustega) ja kergesti mõõdetav ning vähe või optimaalselt kulukas (Cunty *et al.*, 2002; Ferretti & Erhardt, 2002). Kindlasti ei vasta kõik kasutusel olevad meetodid nendele tingimustele. Ajaloo vältel on aga samblike konditsiooni hindamiseks kasutatav metoodika pidevalt uuenenud ja täiusele lähenenud.

Samblike seisundi uurimise võtetest vanim on gaasivahetuse mõõtmine, mida rakendati juba 19. sajandi lõpus Prantsusmaal, et hinnata õhuniiskuse mõju sambliku füsioloogiale (Jumelle, 1891; joonis 1). Meetodi viisid laiemas kasutusse 1960. aastate saksa lihhenoloogid, kes mõõtsid süsihappegaasi vahetust, et uurida samblike fotosünteesi (Lange, 1965; Bertsch, 1966) ja hinnata laborikatsetes kontrollitud tugevusega keskkonnatingimuste mõju samblike füsioloogiale (Lange, 1969). Edasine vajadus mõõta samblike seisundit tekkis 1950. aastatel, mil lihhenoloogid märkasid, et erinevad samblikuliigid reageerivad õhusaastele erinevalt. See omakorda võimaldab neid kasutada bioindikaatoritena (van

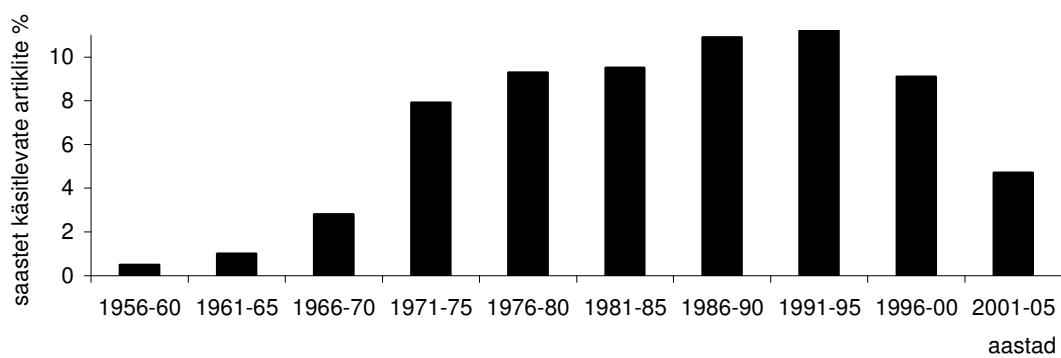
Haluwyn & van Herk, 2002). Kui 1960. aastatel avastati, et peamine samblikke mõjutav saasteaine on vääveldioksiid, muutus saaste mõju uurimine indikaatorliikidega kiiresti lihhenoloogia üheks populaarsemaks suunaks järgneval kahekümnel aastal (Spellerberg, 2005; joonis 2).



Joonis 1. Põhiliste samblike seisundi hindamise meetodite populaarsus aastakümnete lõikes, väljendatud antud meetodit kasutanud artiklite arvuna. Aluseks on 25. aprillil 2006 kirjanduse andmebaasist “Recent Literature on Lichens”, www.toyen.uio.no/botanisk/botmus/lav/sok_rll.htm tehtud päring, kus otsingusõnana kasutati graafikul toodud meetodite märksõnu.

Saaste mõju hindamiseks koostatud õhupuhtuse indeksid põhinesid esialgu ainult samblikukoosluste vaatlemisel, talluse seisundi arvestamine jäi tagaplaanile. Mõiste “samblike vitaalsus” tuli lihhenoloogiasse alles 1980. aastatel ameerika lihhenoloogide artiklitega (Sigal & Taylor, 1979; Nash & Sigal, 1981), kus soovitati bioindikatsioonis liikide katvuse kõrval hinnata ka talluste seisundit, et suurendada hinnangute täpsusastet. 1993. aastal töötas Andreas Werner välja uue õhupuhtuse hindamiseks kasutatava füsioloogilise vitaalsuse indeksi (PVI), mis kombineeris talluse elujõulisust peegeldavaid tunnuseid (nt kasvu, talluse lahuse juhtivust) ja võimaldas transplantatsiooni meetodil anda täpne õhupuhtuse hinnang ka väga saastatud piirkondadele, kus senised indeksid olid liikide puudumise tõttu kasutud (Werner, 1993; Gries, 1996). Samblike vitaalsuse määramist täiustati oluliselt 1980. aastatel seoses taimefüsioloogiliste meetodite (nt ensüümiaktiivsuse ja klorofüllü fluorestsentsi mõõtmise) kohandamisega samblikel (Kricke & Loppi, 2002; joonis 1). Klorofüllü fluorestsentsi mõõtmist, mis määratleb fotosünteesi efektiivsuse kaudu

fotobiondi konditsiooni, hakati lihhenoloogias kasutama 1987. aastal (Jensen & Feige, 1987) ning see on viimasel ajal tõusnud üheks populaarsemaks samblike seisundi hindamise meetodiks (joonis 1). 1980. aastate lõpus lisandunud uus suund – samblike antioksidatiivsete mehhanismide seisundi mõõtmine – ei pälvinud samasugust populaarsust nagu klorofüllü fluorestsentsiga seotud meetodid. Põhjuseks on ilmselt keerukus ja füsioloogilise tausta vähene uuritus. Viimasel viiel aastal on Kristin Palmqvisti eestvõttel hakatud uurima talluse süsiniku-lämmastiku suhet, mida peetakse sümbiontide tasakaalu peegeldajaks (Palmqvist, 2000; Hyvärinen *et al.*, 2002; Dahlman *et al.*, 2003).



Joonis 2. Saastet käsitlevate artiklite osakaal kõigist lihhenoloogilistest publikatsioonidest viie aasta kaupa. Aluseks on 25. aprillil 2006 kirjanduse andmebaasist “Recent Literature on Lichens”, www.toyen.uio.no/botanisk/bot-mus/lav/sok_rll.htm tehtud päring.

Tuleb tõdeda, et samblike seisundi uurimise metoodika on seni jäänud üsna konservatiivseks ja täiustumine toimub aeglaselt. Võrdlemisi palju kasutatakse vanu ja vähetäpseid, ent lihtsaid meetodeid, näiteks katvuse mõõtmist (joonis 1). Lisaks keskendutakse liialt saastatud piirkondade kirjeldavale uurimisele nagu nelikümmend aastat tagasigi, lisamata märkimisväärselt teadmisi õhusaaste ja samblike vitaalsuse seoste kohta. Lisaks saastele ohustavad aga samblikke veel konkurents taimedega, herbivoorid, globaalne kliimamuutus, metsade majandamine ja elupaikade fragmenteerumine (Insarov & Schroeter, 2002; Scheidegger & Goward, 2002; Will-Wolf *et al.*, 2002a). Seetõttu on hädavajalik hinnata samblike vitaalsuse määramise meetodeid objektiivselt ja pöörata rohkem tähelepanu samblike uurimisele looduslikul foonil. Oluliseks panuseks samblike seisundi hindamise metoodika arengusse võib pidada hiljuti ilmunud ülevaatest “Monitoring with Lichens –

Monitoring Lichens” (Nimis *et al.*, 2002a) ja käsiraamatut “Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring” (Kranner *et al.*, 2002), kus tutvustatakse samblike konditsiooni hindamise ja biomonitoringu metoodikat ning rakendusi.

Metsad on üks põhilisi samblike elupaiku, kus nende liigirikkus on väga kõrge (Will-Wolf *et al.*, 2004). Lisaks moodustavad samblikud olulise osa metsaökosüsteemis, sest nad fikseerivad õhulämmastikku, pakuvad elupaika ja toitu selgrootutele, pesamaterjali lindudele ja pisiimetajatele ning on oluliseks talviseks toiduallikaks sõralistele boreaalsetes ja mägimetsades (Will-Wolf *et al.*, 2002a, 2004). Kuna samblikud on poikilohüdrilised organismid, mõjutavad oluliselt nende vitaalsust metsas niiskus- ja kiirgustingimused, õhu ja substraadi temperatuur, tuule tugevus ja kuivamise-taasniiskumise tsüklite muster (Esseen & Renhorn, 1997; Renhorn *et al.*, 1997; Dietz & Hartung, 1999; Palmqvist, 2000; Buffoni-Hall *et al.*, 2003). Nende tegurite tõttu halveneb samblike seisund näiteks pika põua ajal, tormiperioodidel ja külmadel päikesepaistelisel talvedel (Schofield *et al.*, 2003). Mitmed negatiivsed mõjurid toimivad samblikele raie järel ja metsaservas, sest samblikud on siis avatud ekstreemsetele kiirgustasemetele ning temperatuuridele, ent õhuniiskus ei ole küllaldane. Samblikukoosluste vastust sarnastele laialdastele muutustele metsas saab uurida nende vitaalsust määrares (Will-Wolf *et al.*, 2002a). Säilikpuudel kasvavate epifüütide konditsiooni mõõtes saaks hinnata säästva metsamajanduse võtete sobivust samblikele.

Käesolev töö keskendub metsasamblike seisundi hindamise meetoditele tingimustes, kus eeldatavasti ei ole samblike seisundi põhimõjutajaks õhusaaste. Uurimustöö tutvustab metsasamblike konditsiooni hindamiseks kasutatavaid meetodeid, nende füsioloogilist tagapõhja ja rakendust. Analüüsides meetodite lihtsust, täpsust ja universaalsust, püütakse valida neist sobivamad eelkõige välitingimustes kasutamiseks. Vastavalt erineva olemusega lähenemisviisidele jaotub töö kolmeks põhipeatükiks, vastavalt talluse morfoloogial-anatoomial, kasvul ja füsioloogial põhinevad meetodid. Viimases peatükis tehakse analüüsitud infost järeldused ja antakse parimate meetodite valik.

2. TALLUSE MORFOLOOGIAL JA ANATOOMIAL PÕHINEVAD MEETODID

Välimusel tuginevad samblike konditsiooni määramise viisid saab jaotada üldjoontes kolmeks: talluse välisehitusel, paljunemisedukusel ja anatoomial põhinevad meetodid (Gries, 1996).

2.1. TALLUSE MORFOLOOGILISTE TUNNUSTE VAATLEMINE

2.1.1. Samblike morfoloogia ja selle mõjutajad

Tänu koevolutsoonile vetikate ja tsüanobakteritega on lihheniseerunud seened saavutanud suurema morfoloogilise mitmekesisuse ja keerukuse kui ülejäänud seeneriik. Eristatakse kolme põhilist kasvuvormi: koorikjas, lehtjas ja põõsasjas. Sõltumata elupaigast ning kasvuvormist vajab fotobiont fotosünteesi toimumiseks piisavalt valgust, süsihappegaasi ja vett (Büdel & Scheidegger, 1996).

Milliste mehhanismide kaudu keskkond samblike morfoloogiat kujundab, ei ole täpselt teada. Üksikuurimustest võib järeldada, et oluline on temperatuurikõikumiste, substraadi pinnaomaduste (siledal pinnal kasvavatel samblikel on lisastruktuurid, et pidada kinni kiiresti ära voolavat vett), valguse kättesaadavuse (lehtjas kasvuvorm suurendab hõlmasid laiendades valgust püüdvat pinda) ja niiskustingimuste mõju (paksem tallus kuivab aeglasemalt) (Larson, 1981; Larcher & Vareschi, 1988; Ott & Sancho, 1993; Bjerke *et al.*, 2003). Erinevalt paljudest taimedest mõjutab samblike morfoloogiat kõige vähem valguse kättesaadavus, sest enamikul samblikel küllastub fotosüntees juba suhteliselt madalal kiirgustasemel. Pigem seletatakse talluse fenotüübilist plastilisust evaporatsioonimäärade erinevustega (Rikkinen, 1997). Samas ei saa morfoloogiat seostada ainult ühe mõjutajaga, oluline on keskkonnatingimuste kombinatsioon (Ott & Sancho, 1993; Rikkinen, 1997).

Vaatamata paljudele uuringutele, on samblike morfoloogia kujunemise kohta ikka veel liiga vähe teada, sest senini on morfogeneesi uuritud vaid kirjeldavalt (Büdel & Scheidegger, 1996; Honegger, 1996). Kindel on see, et tallus ei arene juhuslikult: juba varasematelgi arengustaadiumitel moodustab sümbiontide kogum iseloomuliku kihilise struktuuri ja toodab liigispetsiifilisi samblikuaineid. Ei ole teada, millised sisemised ja välised faktorid

kujundavad sümbiontse fenotüübi. Ilmselt osalevad morfogeneesis seene või vetika toodetud hormoonid, ent täpsemad tõendid puuduvad. Mõned uurijad arvavad, et sümbiontide interaktsioone vahendab etüleen, mille täpne funktsioon samblikes on seni teadmata (Honegger, 1996).

2.1.2. Talluse morfoloogiliste anomaaliate vaatlemine

Talluse fenotüübi kujunemise põhjuste vähese uurituse tõttu ei ole talluse morfoloogia ja keskkonnatingimuste vahel loodud täpset seost. Tavaliselt võetakse vaatluse alla talluse anomaaliad, mis ilmnevad saasteainete või tugeva päikesekiirguse mõjul ja on enamasti liigispetsiifilised. Kõige üldisem vitaalsuse langusele viitav muutus on talluse tuhmumine (Gries 1996). Selle nähtuse põhjuseks on ilmselt paljude liikide talluses esineva epinekraalse kihi³ paksenemine surnud seene- ja fotobiondirakkude lisandumisel. Tugevas päikesekiirguses võivad epinekraalsesse kihti tekkida ka õhuruumid, mis suurendavad valguse peegeldumist, ja talluse pind omandab hallikas-valge värvuse (Büdel & Scheidegger 1996). Lisaks tugevale kiirgusele on helenemist seletatud ka kiirel kuivamisel koorkihi rakkudes tekkivate gaasimullidega (Chakir & Jensen, 1999). Tuhmumine ei pruugi olla funktsioonitu – külmades piirkondades võimaldab koorkihi õõnelisus isoleerida talluse ülaosa jahedamast substraadist (Ott & Sancho, 1993).

Talluse helenemine on sujuvalt muutuv tunnus, vastavuses keskkonnatingimuste halvenemisega ning täheldatud paljudel liikidel erinevatest kasvuvormidest. Sellest hoolimata ei ole seni välja töötatud vastavat vitaalsuse hindamise metoodikat (Büdel & Scheidegger, 1996; Gries, 1996). Metsasamblike tallus heleneb märgatavalt kasvukohtades, kus kohati esinevad optimaalsest tunduvalt ebasoodsamad kliimatingimused. Näiteks leiti ühes Norras läbiviidud katses, et harilikule kopsusamblikule *Lobaria pulmonaria* sobivas varjulises metsas valitses enne puude lehtimist mai ja juuni üksikutel päevadel kuni kuus korda tugevam kiirgus kui ülejäänud aasta vältel ja see erinevus peegeldus ka talluse toonis (Gauslaa & Solhaug, 2000). Seetõttu tuleks talluse pleekumist ja selle seoseid metsa keskkonnatingimustega rohkem uurida.

Kui talluse tuhmumine on samblikele üldomane nähtus, siis ülejäänud morfoloogilised muutused on enamasti äärmiselt spetsiifilised ega võimalda liikidevahelisi võrdlusi (Gries, 1996). Näiteks on kiirguse mõju talluse morfoloogiale uuritud ka Eesti metsades kasvavatel

³ Epinekraalkiht – sarvjas surnud seeneniitude ja fotobiondirakkude kiht sambliku koorkihis või selle lähedal, vetikarakkude peal (Büdel & Scheidegger, 1996; Randlane & Saag, 2004)

lehtja kasvuvormiga liikidel väike kilpsamblik *Peltigera didactyla*, pruun kilpsamblik *Peltigera rufescens* ja koer-kilpsamblik *Peltigera canina*. Et vähendada kiirgust vastuvõtvat pinda tugevas valguses kujunes mõnevõrra väiksemaks ja paksemaks ainult liigi *Peltigera didactyla* tallus. Liigi *Peltigera rufescens* tallus aga kaheksa aastat väldanud katse jooksul ei paksenenud, sest ilmselt võimaldas tihe vildikiht liigvalgust paremini peegeldada (Bjerke *et al.*, 2003). On oletatud, et kilpsamblikel kasvab ritsiinide⁴ hulk vee kättesaadavuse vähenedes, kuid Kanada teadlase Doug W. Larsoni katsed kummutasid selle väite. Mitmel liigil ritsiine eemaldades ja veesisaldust mõõtes selgus, et ritsiinid osalevad vee omastamises ja säilitamises perekonnas kõrvsamblik *Umbilicariaceae*, aga mitte perekonna *Peltigera* liikidel (Larson, 1981).

Metsades kasvavate põõsajate liikide morfoloogia seoseid keskkonnatingimustega on vähem uuritud. Tähelestatud on oksa-tuustsambliku *Alectoria sarmentosa* morfoloogia muutusi sõltuvalt valgustingimustest: metsaserval kasvavad isendid olid tunduvalt kaharamad, tihedamalt harunenud ja paksemate harudega kui sisemetsas kasvavad pikemad ja sorgus liigikaaslased (Esseen & Renhorn, 1997). Selline hargnev ja suure pindala-ruumala suhtega morfoloogia tagab madalama temperatuuri ja kiirema niiskumise (Hyvärinen, 1992; Büdel & Scheidegger, 1996). Eestis väga levinud halli karesambliku *Pseudevernia furfuracea* morfoloogia plastilisust uuriti Soomes tihedas kuusemetsas kiirgus- ja niiskustingimuste gradiendil (Rikkinen, 1997). Kuna sambliku morfoloogia määrab netoassimilatsioon (Schipperges *et al.*, 1995; Rikkinen, 1997), kujunes hallil karesamblikul niiskes ja hämaras kasvukohas habras, peenikeste tallusehõlmadega vorm, kuivades tingimustes aga rohmakate hõlmadega tallus. Talluse peenenemine vähendas süsinikukadu, suurenev pindala-ruumala suhe intensiivistas aga aurumist. Kuivades tingimustes kohasem väikese pindala-ruumala suhtega morfoloogia tagas väiksemad veekaod (Rikkinen, 1997).

2.1.3. Hinnang meetodile

Talluse välimuse hindamine sobib suurepäraselt samblike konditsiooni hindamiseks välitöödel, sest see on odav ja lihtne ega eelda proovide kogumist. Talluse anomaaliate kasutamise suur puudus on aga liigispetsiifilisus ja madal täpsusaste. Põhiliselt keskendutakse suuremate välimuse muutuste hindamisele väga erinevate keskkonnatingimustega alade võrdlemisel. Praegusel uurituse tasemel talluse anomaaliate vaatlemisel iseseisva meetodina rakenduslik väärtus praktiliselt puudub.

⁴ ritsiin – lehtja või soomusja sambliku substraadile kinnitumise vahend, alumisest koorkihist välja kasvanud seeneniitide kimp (Randlane & Saag, 2004)

2.2. PALJUNEMISSTRUKTUURIDE OHTRUSE HINDAMINE

2.2.1. Samblike paljunemisstruktuurid ja nende mõjutajad

Sarnaselt teistele seentele on enamikul samblikest nii suguline kui ka vegetatiivne elutsükl. Sugulisel paljunemisel levivad ainult seeneeosed, mis tekivad viljakehades. Kottisamblike talluse pinnale moodustunud sugulise paljunemise struktuurid on enamasti apoteetsiumid⁵ või periteetsiumid⁶. Vegetatiivsel paljunemisel levivad sümbiondid koos kas vabanenud tallusetükikestega või spetsiaalsete struktuuride – isiidide⁷ ja soreedide⁸ abil.

Sugulise paljunemise struktuuride loomine vajab palju lisaenergiat, mille tootmiseks peavad keskkonnatingimused olema võimalikult optimaalsed. Seega on viljakehade olemasolu märk sambliku heast konditsioonist, sest stressiseisundis isend suunab vähesed ressursid sugulise paljunemise asemel kasvu (Trass, 1973; Monte, 1993). Ebasoodsates kiirgus- ja niiskustingimustes, kus suguline paljunemine on pärsitud, saavutab ülekaalu vegetatiivne paljunemine (Monte, 1993). Ka vegetatiivsete paljunemisstruktuuride tootmise periood on samblikule energeetiliselt koormav, ent ei eelda siiski optimaalseid tingimusi (Tretiach & Carpanelli, 1992). Viljakehade olemasolu kasutatakse kompleksis teiste indikaatoritunnustega vitaalsusskaalades, kuid iseseisva näitajana on informatiivne paljunemisstruktuuride hulk (Trass, 1973; Monte, 1993). Sealjuures mõjutab keskkond ainult soreedide hulka. Isiidide ohtrust mõjutavad tegurid ja nende moodustumist vallandavad mehhanismid ei ole teada (Larson, 1981; Monte, 1993; Rikkinen, 1997). Kui suguline paljunemine seondub sambliku üldise seisundiga, siis soreedide hulk on pigem otseses seoses mõne üksiku kliimatingimustega (UV-kiirgus, õhuniiskus, temperatuur), mille mõju liigiti erineb (Monte, 1993; Bjerke *et al.*, 2003)

Samblike paljunemist vallandavate mehhanismide kohta on vähe infot. Teatakse, et see on väga tundlik füsioloogiline protsess. Samblike paljunemispotentsiaal võib olla mõjutatud enne muude nähtavate kahjustuste ilmnemist. Lisaks hetkeseisundi peegeldamisele osutab reproduktiivsuse ka samblikukoosluse tulevikule. Püsivalt madal paljunemisstruktuuride arv võib viia populatsiooni kadumiseni (Gries, 1996).

⁵ apoteetsium e. lehtereosla – avatud liua- või kausikujuline (erijuhtudel nõõpnõelakujuline) viljakeha (Randlane & Saag, 2004)

⁶ periteetsium e. sulgeosla – suletud urnikujuline tipmise pooriga viljakeha (Randlane & Saag, 2004)

⁷ isiid – talluse väljakasv, mis sisaldab fotobiondirakke ja seeneniite ning on kaetud koorkihiga; võib olla pulkja, näsaja, koralja jne. kujuga (Randlane & Saag, 2004)

⁸ soreed – väike ümmargune kehake, mis sisaldab mõnda fotobiondirakku ja neid ümbritsevaid seeneniite; soreedidel puudub koorkiht; soreedid on talluse pinnal vabalt või soraalidesse kogunenud (Büdel & Scheidegger, 1996; Randlane & Saag, 2004)

2.2.2. Apoteetsiumite ja soreedide ohtruse hindamine

Soreedide ohtruse hindamiseks tuleb samblik substraadilt eemaldada. Talluse kolmemõõtmelisuse vähendamiseks asetatakse see niisutatuna õrna surve alla kuivama. Seejärel pildistatakse tallust koos skaalatähisega. Fotod tehakse digitaalkaameraga talluse lähedalt, et soreedidega kaetud alade piirjooned oleksid selgelt eristatavad. Edasine analüüs toimub arvutiprogrammi abil (nt Adobe PhotoShop). Mõõdetakse nii paljunemisstruktuuridega kaetud pinda kui ka talluse kogupindala ruutmillimeetrites ja pikslites. Soreedide ohtrus avaldatakse protsendina talluse kogupindalast (Bjerke *et al.*, 2003). Sama meetodikaga on võimalik määrata ka apoteetsiumite ohtrust. Sealjuures ei ole viljakuse näitajana oluline mitte apoteetsiumite suurus, vaid hulk, sest apoteetsiumid kasvavad kaua (vähemalt 12–18 kuud), kuid neis sisalduvad eosed arenevad välja juba enne viljakeha kasvu pidurdumist (Pentecost & Rose, 1985).

On püütud leida viise paljunemisstruktuuride ohtruse hindamiseks talluse kogupindala määramata. Apoteetsiumite ohtrust on väljendatud ka nn fertiilsusprotsendina. Selleks loetakse kokku tallustel paiknevad apoteetsiumid. Suurima apoteetsiumite ohtrusega isendi viljakuseks määratakse sada protsenti ja ülejäänud väärtused leitakse viljakaima suhtes. Väikeste mittesugulise paljunemise struktuuride ohtrust on võimalik hinnata üksikutes talluse piirkondades. Selleks loetletakse struktuuride arv juhuslikult valitud ühikulise pindalaga ruutudel ja arvutatakse aritmeetiline keskmine (Sigal & Nash, 1983).

Samblike paljunemisstruktuuride ohtrust hakati esmalt mõõtma saastatuse indikaatorina (Sigal & Nash, 1983; Gries, 1996). Liigil *Hypogymnia enteromorpha* on leitud tugev seos apoteetsiumite arvu ja õhu saastatuse vahel (Sigal & Nash, 1983). Looduslike tegurite mõju soraalide hulgale on määratud liikidel väike kilpsamblik *Peltigera didactyla* ja pruun kilpsamblik *Peltigera rufescens*. Katsetes leiti, et temperatuuri tõus vähendas soraalide hulka, aga UV-kiirguse mõju puudus (Bjerke *et al.*, 2003). Paljunemisstruktuuride ohtruse mõõtmist kui suhteliselt lihtsat meetodit võiks metsasamblikel rohkem rakendada ja täpsemalt uurida.

2.2.3. Hinnang meetoditele

Paljunemisstruktuuride ohtruse hindamise headeks omadusteks on odavus ja lihtsus. Selle meetodi kasutusvõimalused on aga piiratud. Paratamatult saab soreedide ja apoteetsiumite ohtrust määrata ainult liikidel, kellel neid esineb. Näiteks kui meetodina kasutada

apoteetsiumite ohtrusest, siis piirab see paratamatult uuritavate liikide arvu. Teiseks paljunemisstruktuuride ohtruse hindamise probleemiks on paljunemise ja keskkonnatingimuste seose vähene uuritus: ei ole teada, kui täpselt määratleb paljunemisstruktuuride ohtrus sambliku vitaalsuse ja kui suur on loodusliku varieeruvuse osa. Kui samblikust soovitakse saada tõest kahemõõtmelist kujutist, on see meetod destruktiivne. Kuid paljunemisstruktuuride ohtrusest on võimalik hinnata ka välitingimustes ja tallust kahjustamata.

2.3. TALLUSE ANATOOMILISTE TUNNUSTE VAATLEMINE

2.3.1. Talluse siseehitus

Enamikul samblikest on kihiliselt organiseeritud siseehitus. Pealt katab samblikku tihe seenehüüfide põimik – ülemine koorkiht. Selle all on õhuke fotobiondirakke sisaldav vöönd ja seejärel paks südamikukiht ehk medulla, mis koosneb hõredalt ja korrapäraselt paiknevatest seeneniitidest. Enamasti esineb lehtjatel samblikel veel neljaski tallusekiht – tihendunud seeneniitidest alumine koorkiht (Büdel & Scheidegger, 1996). Kõige informatiivsem on neist fotobiondi kiht, mille kahjustused avalduvad esimesena, sest mükobiont on vähem tundlik (Gries, 1996).

Talluse anatoomiat vaadeldes saab määrata rakkude paljunemise efektiivsust, fotosünteesiva komponendi konditsiooni, rakukahjustusi, tallusekihtide paksusi, autotroofsuse-heterotroofsuse suhet ja varuainete hulka (Larcher & Vareschi, 1988; Büdel & Scheidegger, 1996; Bjerke *et al.*, 2003). Neid sambliku vitaalsuse indikaatortunnuseid mõjutab eelkõige netofotosüntees,⁹ mis määrab talluse biomassi suunatava ainese hulga. Seega väljendab talluse siseehitus keskkonnatingimuste – õhuniiskuse, temperatuuri, kuivamis-niiskumistsüklite mustri, valguse ja süsihappegaasi kättesaadavuse – soodsust (Nash, 1996b).

2.3.2. Valgusmikroskoobiga vaadeldavad tunnused

Valgusmikroskoopilisteks uuringuteks lõigatakse žiletti, skalpelli või mikrotoomi kasutades tallusest umbes 1–4 mikromeetri paksused ristlõigud. Proovid on soovitatav võtta samal kaugusel tallusetipust, sest anatoomilised tunnused varieeruvad sõltuvalt hõlma pikkusest.

⁹ netofotosüntees – süsihappegaasi assimileerimise ja hingamise vahe (Masing, 1992)

Tavaliselt võetakse ristlõik stereomikroskoobis vaadeldes talluse tipust 0.3–5 millimeetri kauguselt. Edasiste vaatluste lihtsustamiseks peitsitakse preparaat värvainega, enamasti toluidiinsinise (Holopainen & Kauppi, 1989; Bennett, 2002; Bjerke *et al.*, 2003).

Valgusmikroskoobi abil saab hinnata sambliku fotosünteesi efektiivsust, määrates sambliku surnud ja plasmolüüsunud vetikarakkude osakaalu. Selleks vaadeldakse vähemalt kuut proovist tehtud ristlõiku ja neist igaihes mõnikümnet kuni sadat fotobiondirakku. Surnud rakkudeks loetakse tühje, eristamatu sisuga rakukesti. Plasmolüüsi läbinud rakkude tunnuseks on kollapseerunud ja peitsiga värvunud sisu. Neist kahest on informatiivsem viimast tüüpi rakkude osakaal. Plasmolüüs väljendab hiljutist kahjustust, aga surnud vetikarakkude kestad jäävad kauemaks püsima ja nende mõningane olemasolu proovis on loomulik ja seletatav vananemisega (Holopainen & Kauppi, 1989).

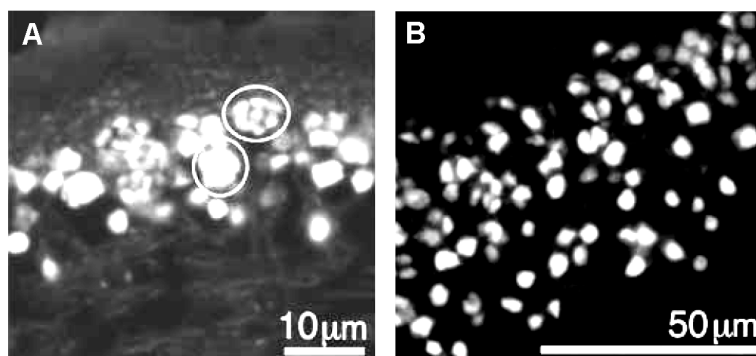
Teiseks mõõdetakse valgusmikroskoobi abil tallusekihtide paksust. Selle meetodi juures on oluline, et proov ei moonduks preparaadi tegemisel. Kindlasti ei tohi talluse ristlõiku katteklaasiga suruda. Üksikud uurijad hoiavad ettevaatuse mõttes samblikke enne lõikamisi vedelas lämmastikus (Larcher & Vareschi, 1988; Bjerke *et al.*, 2003). Proovi tallusekihte mõõdetakse vähemalt kolmes korduses, kusjuures erinevate kihtide paksused ja kogu talluse paksus mõõdetakse ükshaaval, mitte ei arvutata (Bjerke *et al.*, 2003). Talluse kogupaksust on edukalt määratud ka mikromeetriga (Heidmarsson, 1998). Mõned uurijad soovivad kihte vaadelda fluorestsentsmikroskoobi all, sest koor-, südamiku- ja vetikakihi erineva fluorestsentsvärvusega samblikuained teevad kihtide eristamise lihtsamaks (Hyvärinen, 1992; Schofield *et al.*, 2003). Tavaliselt määratakse siiski ainult fotobionti sisaldava vööndi paksus ja lõpptulemus arvutatakse kujule vetikakihi paksus talluse kogupaksuse kohta. (Bennett, 2002).

Tavaliselt mõõdetakse vetikakihi paksust ja fotobiondi rakkude seisundit kui saasteindikaatoreid (Eversman, 1978; Holopainen & Kauppi, 1989; Bennett, 2002). Aga näiteks fotobiondi ja mükobiondi osakaalu võrdlus on ka ökoloogilise tähtsusega, näidates autotroofsuse ja heterotroofsuse suhet sümbioosis (Larcher & Vareschi, 1988). Metsasamblikest on valgusmikroskoobi abil uuritud hariliku hallsambliku *Hypogymnia physodes* talluse paksust sõltuvalt niiskustingimustest. Südamikukihi paksus oli ootuspäraselt kõigis proovides muutumatu, kuid niiskete kasvukohtade isenditel toimus vetikakihi paksenemine, kuivades tingimustes paksenes aga ülemine koorkiht (Hyvärinen, 1992). Tulemus on mõneti vastuoluline, sest tavaliselt toimub ebasoodsates oludes fotobiondikihi paksenemine (Larcher & Vareschi, 1988).

2.3.3. Fluorestsentsmikroskoobiga vaadeldavad tunnused

Fluorestsentsmikroskoopia suurim erinevus valgusmikroskoopiast on ultravioletsete kiirte kasutamine valgusallikana. Selles nn ergastusvalguses kiirgavad erinevad fenoolsed ühendid sõltuvalt nende keemilisest ehitusest kindlat värvi fluorestsentsvalgust. Näiteks klorofüllid sisaldavad piirkonnad fluorestseeruvad punaselt. Lisaks on fluorestsentsi intensiivsus proportsionaalne fluorestseeruva ühendi hulga (Padu, 2001). Seega võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hinnata fotobiondirakkude vitaalsust nende klorofüllid sisalduse järgi.

Vetikarakkude vitaalsust fluorestsentsmikroskoobi abil uurides määratakse surnud rakkude protsent ja hinnatakse elusate rakkude värvi. Tervetel fotobiondirakkudel on sinises ergastusvalguses punane fluorestsents, mis raku kahjustudes muutub algul tuhmimaks, siis pruunikaks, oranžiks ja lõpuks rakkude hukkudes valgeks. Valgete rakkude osakaal proovis arvutatakse surnud vetikarakkude protsendiks. Vetikakihi elusate rakkude seisundit on esitatud neljätähelise koodiga, kus iga täht väljendab veerandi vaadeldud rakkude värvust (R-punane, D-tuhm punane, B-pruunikas, O-oranž). Näiteks kood 5 RRRB tähendab, et proovis oli 5% rakkudest surnud ja 25% elusatest fluorestseerusid pruunikalt (Holopainen & Kauppi, 1989).



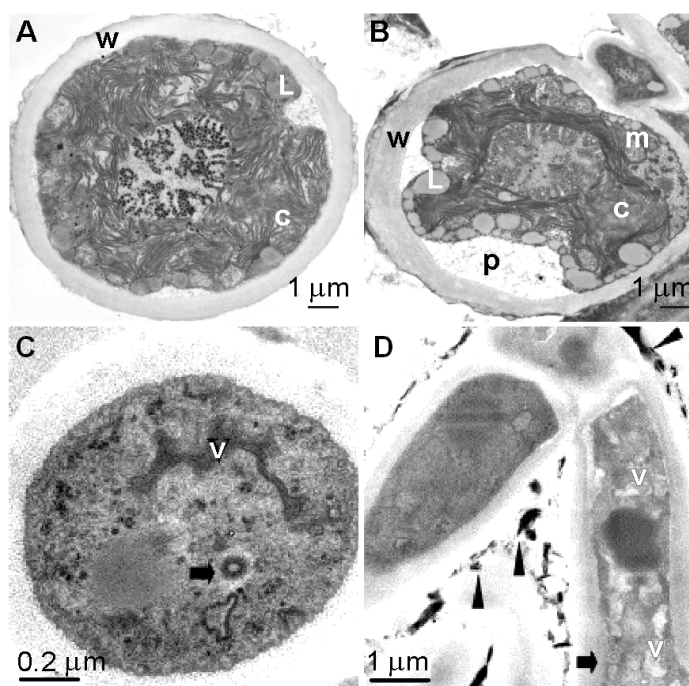
Joonis 3. Fluorestsentspildid sambliku *Lobaria pulmonaria* vetikarakkude populatsioonist (a) 1,5 ja (b) 30 millimeetri kaugusel hõlmatipust tehtud talluse ristlõikudes. Jagunevate rakkude kogumid on piiritletud valgete ringidega (Schofield *et al.*, 2003).

Teiseks kasutatakse fluorestsentsmikroskoopiat vetikarakkude paljunemisedukuse hindamiseks. Selleks vaadeldakse talluse ristlõike, mis on tehtud tipust vähemalt 0,5–2,5 millimeetri kauguselt, sest talluse servavööndis fotobiondirakud ei paljune. Vetikarakkude

jagunemise piirkonnas on märgatavad iseloomulikud rakukobarad tavaliselt neljast kuni kaheksast rakust (joonis 3). Nende kogumite arv avaldatakse protsendina kõigist vetikarakkudest. Kanadas läbi viidud katseseerias oli paljunevate vetikarakkude osakaal liigil harilik kopsusamblik *Lobaria pulmonaria* tugevalt seotud keskkonnatingimuste soodsusega (Schofield *et al.*, 2003).

2.3.4. Elektronmikroskoobiga vaadeldavad tunnused

Suurema lahutusvõime saavutamiseks tekitab elektronmikroskoobis valguse asemel kujutise elektronide voog. Seetõttu on elektronmikroskoobiga saadav pilt mustvalge: tumedad alad neelavad ja heledad alad lasevad elektrone läbi (Murray *et al.*, 2005). Elektronmikroskoobi suur lahutusvõime võimaldab uurida organellide ehitust ja seisundit.



Joonis 4. Vetika- ja seeneraku elektronmikroskoobiga nähtavad kahjustused. (a) Kahjustamata ja (b) kahjustatud (kokkutõmbunud kloroplastiga, tugevalt plasmolüüsunud) fotobiondi *Trebouxia* rakud pruunikast narmassamblikust *Bryoria fuscescens* (Tarhanen *et al.*, 2000), (c) kahjustamata ja (d) kahjustatud, rohkeste vakuoolidega hüüfid epiliitsest seenekooslusest (de los Rios *et al.*, 2004). Tähistused: [w] – rakukest; [c] – kloroplast; [L] – tsütoplasma lipiidid; [m] – mitokonder; [p] – plasmolüüs; [v] – vakuool.

Ultrastruktuursete kahjustuste puhul eristatakse tavaliselt kuut staadiumi, millest esimese puhul on rakk terve. Järgnevates faasides annavad fotobiondi kahjustustest märku näiteks kloroplasti kuju muutused, tsütoplasma tihenemine, vakuooli sisaldiste ladestumine ja tülakoidide lagunemine. Mükobiondis toimub samal ajal mitokondrite pundumine, vakuoolide ruumala ja hulga suurenemine, varuainekogumite vähenemine ja tsütoplasma sõmerdumine (Holopainen & Kauppi, 1989; Gries, 1996; joonis 4). Tavaliselt vaadeldakse pigem fotobiondi organelle, sest nende struktuur on reeglina selgemalt eristatav (Eversman & Sigal, 1984). Lisaks organellidele vaadeldakse elektronmikroskoobiga veel tallusekihtide struktuuri, eriti hüüfide ja koorkihi ehitust ning vett tõrjuvate ühendite paiknemist (Hyvärinen, 1992; Dyer, 2002).

Elektronmikroskoopiat kasutatakse enamasti happevihmade, vääveldioksiidi, osooni ja raskemetallide mõjude hindamiseks organellide või tallusekihtide tasemel, sest sellised tugevad saastajad tekitavad iseloomulikke ehituslikke muutusi (Holopainen & Kauppi, 1989; Tarhanen *et al.*, 1997; Tarhanen, 1998; Purvis *et al.*, 2000; Garty *et al.*, 2002a; Hauck, 2003). Metsasamblikel on laialdaste rakukahjustuste otsimise asemel otstarbekam uurida talluse struktuuri: koor- ja vetikakihi ehitust ning neid moodustavate hüüfide iseloomulikke tunnuseid. Näiteks on leitud, et elektronmikroskoobiga nähtavad vett tõrjuvad ühendid hüüfide pinnal on samblike sümbioosi toimimiseks hädavajalikud, sest nende paiknemine reguleerib vee liikumist talluses (Dyer, 2002; Trembley *et al.*, 2002). Näiteks harilikku hallsamblikku *Hypogymnia physodes* uurides leiti, et kuivast kasvukohast pärit isenditel olid seenehüüfid paksuseinalised nii koor- kui ka vetikakihis ning nende pinnale oli ladestunud tihendav geeljas mass. Seevastu niiskemas kliimas kujunes tallus õõnelisemaks ja vetikakihi hüüfide kestad õhemaks (Hyvärinen, 1992).

2.3.5. Hinnang meetoditele

Mikroskoopia meetodite suur eelis on nende universaalsus – sisestruktuuri saab uurida kõigil samblikel. Teisalt ei saa kõiki mikroskoopias vaadeldavaid tunnuseid pidada piisavalt sisukaks. Elektronmikroskoopias võib küll vaadelda väga erinevaid kahjustuste astmeid, ent optimaalsele lähedastes tingimustes ei ole organellide vaatlused enam informatiivsed. Kuigi valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia abil saab näidata erinevusi ka heas seisundis talluste vahel, ei ole need muutused eriti suured. Kõik mikroskoopia meetodid vajavad aparatuuri, on destruktiivsed ja ainult sisetingimustes kasutatavad.

3. TALLUSE KASVUL PÕHINEVAD MEETODID

3.1. KASVU OLEMUS

Organismi kasvu mõistetakse kui tema mõõtmete suurenemist (Masing, 1992). Sambliku kasv tähendab talluse lineaarse mõõtme, pindala ja/või biomassi suurenemist. Kasvu on peetud võrdlemisi objektiivseks talluse vitaalsuse näitajaks, kuna seda mõjutavad nii sisemine seisund kui ka keskkond. Sisemistest teguritest määravad samblike kasvu foto- ja mükobiondi liik, talluse vanus, geno- ja fenotüüp (Hill, 2002). Välistest teguritest mõjutavad metsasamblike kasvu substraat (puu vanus, koore pH, keemiline koostis ja temperatuur), vee, toitainete ja valguse kättesaadavus, õhusaaste ja biotilised faktorid (nt herbivooride kahjustused ja konkurents) (Nash, 1996b; Hill, 2002; Will-Wolf *et al.*, 2002a, 2004; Dahlman & Palmqvist, 2003; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004a). Samadel keskkonnatingimustel ei ole kasv siiski üheselt määratletud, vaid võib tugevasti varieeruda isegi sama talluse harude vahel (Nash, 1996b; Palmqvist, 2000).

Talluse mõõtmete suurenemisel toimub foto- ja mükobiondi samaaegne, koordineeritud ja tasakaalustatud ressursijaotusega kasv, mille komponendid on rakujagunemine ja ekspansioon (Nash, 1996a, 1996b; Dahlman, 2003). Seega pidurdub kasv ka ainult ühe sümbiondi kahjustumisel. Kasvuprotsessis domineerib mükobiont, kes kontrollib fotobiondi kasvu ja paneb aluse apikaalsele ehk pikenemiskasvule, mille tagab turgor seeneniidistik. Hüüfid pikenevad kõige intensiivsemalt talluse servas, hõlmatippudes (Dahlman, 2003). Fotobiont mõjutab kasvu süsiniku metabolismi kaudu. Kui kasvuks vajalikud mineraalained jõuavad mõlema sümbiondini atmosfäärist, siis biosünteesiks ja energiaallikaks vajaliku ning turgorit tagavate osmootsete ühendite koostises oleva süsiniku hangib ainuüksi fotobiont (Nash, 1996a; Palmqvist, 2000). Seetõttu on talluse kasv otseselt seotud metaboolselt aktiivsele tallusele langeva kiirguse hulgaga (Palmqvist & Sundberg, 2000). Kuna talluse biomass koosneb põhiliselt süsivesikute ekvivalentidest, siis on sambliku kasv võrdelises seoses fotosünteesis toodetud ja hingamisest üle jäänud süsiniku kogusega (Palmqvist, 2000). Sealjuures on samblike biomassi kasv seotud rohkem süsiniku ja pindala suurenemine lämmastiku omastamisega (Sundberg *et al.*, 2001).

Keskkonnatingimustest mõjutavad sambliku kui terviku mõõtmete suurenemist põhilised fotosünteesi intensiivsust määravad tegurid: vee kättesaadavus, õhu ja substraadi temperatuur ning süsihappegaasi kontsentratsioon õhus (Nash, 1996b). Eelkõige määravad

kasvu perioodid, mil tallus on niiske. Märja ja metaboolselt aktiivsena limiteerib sambliku kasvu valguse kättesaadavus, temperatuur on aga suhteliselt ebaoluline (Armstrong, 1974; Nash, 1996b). Optimaalsetel tingimustel suudavad samblikud valgusenergiat biomassiks muundada sama efektiivselt kui soontaimedki (Palmqvist & Sundberg, 2000; Dahlman, 2003).

Tavatingimustes kasvavad samblikud siiski aeglasemalt kui enamik soontaimi, mistõttu üksiktalluse kuist kasvu saab määrata vaid üksikutel kiiremini kasvavatel liikidel – näiteks kilpsambliku *Peltigera* perekonna liigid võivad kasvada kuni 27 millimeetrit aastas (Gries, 1996). Sagedamini mõõdetaksegi talluse aastast juurdekasvu. Lehtja tallusega liigid kasvavad keskmiselt 0,5–4, põõsasjad 1,5–5 ja koorikjad 0,5–2 millimeetrit aastas, samas paljud liigid ületavad oma kasvuvormile iseloomuliku keskmist väärtust (Nash, 1996b).

Kasvukiiruste varieeruvus tuleneb osaliselt erinevatest kasvumustritest, mis jagatakse kolmeks: pseudomeristeemne, interkalaarne ja korrapäratu kasv. Neist on enim uuritud ainult talluse tsentri või tipuosade pseudomeristeemses vööndis toimuv kasv, mis on iseloomulik lehtjale ja põõsasjale kasvuvormile (näiteks harilikul seinakorbal *Xanthoria parietina* ja sugukonnas kilpsamblikulised *Peltigeraceae*). Teiseks esineb liike (nt harilik kopsusamblik *Lobaria pulmonaria*), kes lisaks tsentrile või tipuosale laienevad ka vanematest talluseosadest. Kõige vähem on uuritud kõrvasamblikuliste sugukonnale *Umbilicariaceae* omast korrapäratut kasvumustrit, kus kõigil talluseosadel on kasvamisvõime. Selline kasv on ka hariliku põissambliku *Lasallia pustulata* iseloomuliku kräsulise serva põhjus. Lisaks võivad kasvumustrid omavahel kombineeruda (Honegger, 1996).

3.2. ÜSIKTALLUSE KASVU MÕÕTMINE

Vaatamata suurele varieeruvusele liikide ja kasvuvormide vahel, püütakse siiski leida universaalseid kasvu hindamise viise. Kasvu mõõtmise meetodid saab üldjoontes jagada kolmeks: lineaarsed, pindalalised ja massi mõõtmised (Hill, 2002). Kuigi kasv on kolmemõõtmeline protsess, väljendatakse seda enamasti lineaarses mõõtmes – raadiuse suurenemise (lehtjas ja koorikjas tallus) või harude pikenemisena (põõsasjas tallus) millimeetrites aasta kohta (Nash, 1996b; Palmqvist, 2000). Erinevalt paljudest mikroorganismidest ja kõrgematest taimedest ei ole samblike pikenemiskasv oma olemuselt logaritmiline, vaid on siirdevorm eksponentsiaalse ja lineaarse kasvu vahel (Armstrong,

1973; Hill, 2002; Fortin & Dale, 2005). Kuna talluse ekspansioon sõltub tema pindalast ja massist, siis enamasti arvutatakse kasvu andmetest talluse suhteline kasvumäär RGR (ingl k Relative Growth Rate), mis väljendab mõõtmete suurenemist algsete mõõtmete kohta ja võimaldab võrrelda erinevates töödes saadud tulemusi (Nash, 1996b; Hill, 2002; Palmqvist, 2000).

3.2.1. Lineaarsed mõõtmised

Ajalooliselt vanem on talluse kasvu otsene mõõtmine joonlaua, mõõtesirkli, kaasaskantava mikroskoobi või mikromeetriskaalat sisaldava luubiga. Kuna kasv sõltub talluse suuruselt, on soovitatav mõõta samaaegselt eri suuruses talluste diameetreid. Kasvumäära leidmiseks on vajalikud talluse diameetri korduvad mõõtmised. Selleks tehakse enne esimest mõõtmist substraadile alates talluse servast talluse raadiusega samas sihis märgid iga millimeetri järel (Armstrong, 1973; Hill, 2002). Talluse diameeter määratakse ainult esimesel mõõtmisel, järgnevatel kordadel hinnatakse luubi abil talluse hõlmatipu asukohta substraadile märgitud millimeetriskaalal. Kuna kasvu mõõtmine toimub pika ajaperioodi vältel, tuleb skaala märkimisel arvestada ka keskkonnamõjudega. Seetõttu on soovitatav jooned tõmmata veekindla tušiga eelnevalt värviga heledamaks toonitud taustale (Hill, 2002) või kraapida peenikese nõelaga otse substraati (Armstrong, 1973).

Rohkem ja kallimat aparatuuri eeldab talluse lineaarse kasvu kaudne mõõtmine fotode abil, milleks on vajalikud fotoaparaat ja kolmjalg. Enne pildistamist kinnitatakse substraadile tallusega samale tasandile skaala, mis läbib talluse kasvukeset. Vaatevälja jäetakse piisavalt vaba ruumi talluse kasvuks. Fotode suurendamise ja ilmutamise järel mõõdetakse talluse diameetrid sarnaselt eelnevalt kirjeldatud otsesele mõõtmisele. Kõik mõõtmised fotodel tehakse ühel radiaalsel joonel talluse kasvupunktist substraadil oleva iseloomuliku märgini (pragu või mügarik), mis on näha igal fotol (Hill, 2002). Harvem mõõdetakse talluseserva kaugust iseloomulikust punktist tallusel (Armstrong, 1973).

Üksikute talluste diameetrite andmete kogumisele järgneb tulemusi koondav andmeanalüüs. Vajaliku arvu mõõtmiste kordamisel sobivate ajavahemike järel arvutatakse andmetest talluse radiaalne kasv millimeetrites aastas ja lõpuks suhteline kasvumäär vastavalt samblike jaoks välja töötatud kasvumudelitele (Hill, 1981, 2002)

Talluse radiaalset kasvu mõõdetakse eelkõige kividel kasvavatel liikidel. Enim uuritud liigid on kase-pruunsamblik *Xanthoparmelia conspersa* ja harilik kaartsamblik *Rhizocarpon geographicum*. Liikide lineaarset kasvu määratakse eelkõige selleks, et rakendada andmeid lihhenomeetrias (Calkin & Eillis, 1980; McCarthy, 1997; Armstrong, 2005a, 2005b) või uurida kasvuprotsessi ja täiustada kasvumudeleid (Armstrong, 1973; Armstrong & Smith, 1996, 1998; Armstrong, 2002). Metsasamblike seisundi hindamiseks mõõdetakse lineaarset kasvu suhteliselt harva ja eelistatult rippuval põõsasjal kasvuvormil. Näiteks Kalifornias võrreldi transplantatsioonikatsetes merelise ja mandrilise kliima tingimustes kasvavate põõsajämbliku *Ramalina menziesii* populatsioonide kasvu aastaegade lõikes ja leiti, et kontinentaalses kliimas oli kasv aasta jooksul peaaegu konstantne (Boucher & Nash, 1990). Servaeefekti uurides on põõsajämblike liikide tallusi mõõtnud Rootsi lihhenoloogid. Näiteks oksa-tuustsambliku *Alectoria sarmentosa* habejaid tallusi võrreldes leiti, et kaugus metsaservast ja talluse maksimumpikkus on väga tugevalt seotud: metsaserva pikim tallus oli peaaegu poole lühem metsa südames kasvavast. Andmetest järeldus, et servaeefekti tugevaim mõjupiirkond ulatus servast kahe puu pikkusele vastava kauguseni (Esseen & Renhorn, 1997, 1998).

3.2.2. Pindalalised mõõtmised

Talluse pindala muutusi ei saa mõõta nii otseselt kui raadiuse suurenemist. Põhilised võtted on pindala arvutamine talluse diameetrist või raadiusest, tallusekujulise paberiväljalõike kaalumine (kui on teada paberi kaalu ja pindala suhe) või skaneerimine (Smith, 1995; Honegger *et al.*, 1996). Kasvuprotsessi jälgimiseks kopeeritakse sambliku kontuur kilele, ent siis jääb tulemuse täpsus alla poole millimeetri ja sellest järelduvalt ei saa tallust mõõta tihedamini kui ühe aasta järel (Gilbert, 1971; Armstrong, 1973). Pindala kasvu on soovitatav väljendada ümbermõõdu kohta (Hill, 2002).

Erinevalt lineaarsest kasvust mõõdetakse pindalalist kasvu suhteliselt harva. Pindala muutusi jälgitakse enamasti tallust kunstlikes tingimustes kasvatades, et keskkonnatingimusi täpselt kombineerides saada uusi teadmisi samblike kasvuprotsessist ja selle mõjutajatest (Gilbert, 1971; Bando & Sugino, 1995; Dahlman & Palmqvist, 2003). Metsasamblike pindala kasvu on tavaliselt mõõdetud lehtja kasvuvormiga liikide transplantatsioonikatsetes. Näiteks selgitati Inglismaal haruldase laiuva kopsusambliku *Lobaria amplissima* kunstlikku levitamisevõimalust talluse tükikesi puudele kleepides. 20 aastat väldanud uurimuse tulemusena leiti, et transplatatsioon oli edukas ka väga väikeste talluseosade siirdamisel, sest

nad saavutasid normaalse kasvukiiruse juba esimesel aastal (Gilbert, 2002; Richardson & Cameron, 2004). Proovitud on ka pöördtransplantatsiooni. Näiteks vahetati hariliku kopsusambliku *Lobaria pulmonaria* isendeid Portugali ja Rootsi elupaiga vahel, et uurida, kuidas liik käitub erinevates piirkondades ja mis tema kasvu limiteerib. Eeldati, et Portugali valgusküllases metsas kasvavad mõlema piirkonna isendid kiiremini, aga andmed tõestasid vastupidist – valgus ei olnud kasvu limiteeriv faktor (Gaio-Oliveira *et al.*, 2004a).

3.2.3. Biomassi mõõtmised

Biomassi mõõtmiseks on vaja tallus ühes tükis substraadilt eemaldada ja kinnitada raamile või asetada anumasse, et oleks võimalik teha korduvaid mõõtmisi tallust lõhkumata (McCune *et al.*, 1996; Hyvärinen & Crittenden, 1998; Hill, 2002; Caldiz, 2004). Massi väljendatakse alati kuivmassina. Selle arvutamiseks koostatakse kaliibergraafik, mis seob õhuniiskuse kuivmassi suurenemisega. Saadud andmetest arvutatakse suhteline kasvumäär valemist $RGR = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$, kus kuivmassi muutus on jagatud vastava ajavahemikuga. Biomassi kasvu on soovitatav väljendada pindala kohta, kuna biomass sõltub talluse valgust neelava pinna suurusest. Õigeks ei peeta biomassi muutuse väljendamist algse biomassi kohta, kuna ei ole teada, kuidas olemasolev mass mõjutab massi lisandumist (Hill, 2002; Will-Wolf *et al.*, 2002a).

Biomassi muutusi mõõdetakse tavaliselt keskkonnatingimuste mõju uurimisel. Näiteks on uuritud lämmastikusaaste ja happevihmade mõju maapinnal kasvavatele liikidele (Scott & Hutchinson, 1987; Sundberg *et al.*, 2001). Metsasamblike biomassi on mõõdetud eelkõige servaeefekti käsitlevates töödes. Näiteks Rootsi kirdeosas määrati kuuel kaugusel raielangist transplanteeritud halli hõlmasambliku *Platismatia glauca* ja hariliku kopsusambliku *Lobaria pulmonaria* biomassi suurenemine 16 kuu jooksul. Üllatuslikult ei olnud kasv serva lähedal aeglustunud ja kõrgeimad kasvuväärtused saavutati servast 12 meetri kaugusel, mitte häirimata metsa tuumalas (Renhorn *et al.*, 1997). Teises, Rootsi põhjaosas tehtud töös võeti liikide asemel vaatluse alla põõsasjas (põhiliselt oksa-tuustsamblik *Alectoria sarmentosa* ning perekondade narmassamblik *Bryoria* ja puuhabe *Usnea* liigid) ja lehtjas kasvuvorm (põhiliselt harilik hallsamblik *Hypogymnia physodes*, toru hallsamblik *Hypogymnia tubulosa*, hall hõlmasamblik *Platismatia glauca*, männi-rebasekõrv *Vulpicida pinastri*, ääris-oksasamblik *Cetraria chlorophylla* ja vagu-lapiksamblik *Parmelia sulcata*) ja paigutati raamidele kinnitatuna puudele sajameetrisel transektil, mis ulatus servast metsa keskosani. Servaepekt väljendus biomassis väga selgelt. Katsetest järelduvalt oli servatingimustele

kõige tundlikum oksa-tuustsamblik *Alectoria sarmentosa*, mistõttu erinevus kasvuvormide reaktsiooni vahel näis suur (põõsasja kasvuvormiga liikide biomass vähenes rohkem). Samas leiti üllatuslikult, et põõsasjate liikide biomass suurenes kiiremini – seega ei tulenenud nende tundlikkus aeglasest kasvust (Renhorn, 1997).

3.2.4. Hinnang meetoditele

Kasvu mõõtmise puuduseks on pikk ajaskaala, mistõttu tulemusi ei saa kiiresti ning andmetes ei väljendu vahepealsed äkilised keskkonnamuutused (Gries, 1996; Hill, 2002). Kuna samblikud kasvavad väga aeglaselt, nõuab mõõtmine väga suurt täpsust, sest iga viga mõjutab oluliselt tulemust. Näiteks lineaarsete mõõtmiste puhul tuleb alati mõõta diameetrit samal mõttelisel sirgel ja pildistades tagada kaamerale muutumatu asend. Enne iga mõõtmist tuleb kindlaks teha, et tallus ei ole oma osi kaotanud nt tuule või herbivooride mõjul. Väga oluliselt mõjutab kasvu hinnangut õhuniiskus, põhjustades talluse pundumist või kokkutõmbumist, mistõttu talluse diameetrit ja pindala tuleb alati mõõta konstantsetes kliimatingimustes või koostada biomassi mõõtmiste jaoks vastav kaliibergraafik (Hill, 2002). Kõige ebatäpsem on talluse pindala muutuste mõõtmine servajoont kiledele kopeerides, seega on see usaldusväärne meetod ainult äärmiselt pikaajalistes uuringutes.

Viimased veerand sajandit kasutusel olnud samblike kasvumudeleid, millel põhineb kasvuandmete analüüs, arvatakse olevat reaalsusest üsna kaugel. Näiteks eeldavad need, et fotosünteesi intensiivsus talluseosade vahel ei erine ja loevad kasvu alustalaks süsivesikute transporti, mille füsioloogilisest mehhanismist on ikka veel liiga vähe teada (Nash, 1996b, Palmqvist, 2000; Hill, 2002).

Tabel 1. Erinevate kasvu mõõtmise meetodite sobivus kasvuvormidele (Hill, 2002 järgi).

Tähistused: [+] – meetod sobib antud kasvuvormile; [–] – meetod ei sobi antud kasvuvormile; [+/-] – meetod on antud kasvuvormil rakendatav, aga mitte sobilik.

Kasvuvorm	Meetodid		
	Lineaarne kasv	Pindalaline kasv	Biomassi kasv
põõsasjas	+	–	+
lehtjas	+	+	+
koorikjas (ringjas)	+	+	–
koorikjas (hajus)	–	+/-	–

Kasvumõõtmiste probleemiks on ka erinevates töödes saadud tulemuste võrreldamatus. Ühelt poolt ei saa ühildada biomassi, raadiuse ja pindala muutustest arvatud kasvu. Näiteks talluse diameeter võib suureneda ilma biomassi kasvuta ja vastupidi. Teisest küljest on raske võrrelda erinevate kasvuvormide kasvumäärasid (tabel 1). Kõige paremini sobib kasvu mõõtmine lehtjale kasvuvormile, millel kasvu mõõdetakse enamasti biomassi suurenemise või harude pikenemisena, sest tallus on substraadist suhteliselt kergelt eraldatav ja eristatav. Kõige raskem on mõõta koorikja kasvuvormi kasvu, mispuhul ei saa selgelt eristada talluseserva, sest tallus moodustab substraadiga lahutamatu terviku (Büdel & Scheidegger, 1996; Hill, 2002).

Ent kasvu mõõtmise metoodikal on ka häid külgi. Esiteks saab kasvu suurepäraselt mõõta välitingimustes ja see vajab minimaalselt tehnilisi abivahendeid. Teiseks on kasvu mõõtmine erinevalt paljudest muudest seisundi hindamise meetoditest mittedestruktiivne ja samal materjalil saab uurida näiteks füsioloogilisi tunnuseid (Hill, 2002).

3.3. KATVUSE MÄÄRAMINE

Lähtuvalt samblike aeglasest kasvust saab nende seisundit lisaks määrata veel katvuse kaudu, mis koosneb mitme isendi kasvust. Siiski seostatakse katvuse mõõtmist tihti ohtruse hindamise meetoditega, mis vastavad küsimusele “kui palju”, ega tegele otseselt üksiku talluse seisundi hindamisega. (Will-Wolf *et al.*, 2002a, 2002b).

Katvuse otsesel määramisel hinnatakse talluste osakaalu proovi alajaotustes või transektil väljendatuna katvusprotsendina kogupindalast või kogupikkusest (Will-Wolf *et al.*, 2002a). Okstel mõõdetakse katvust enamasti transektimeetodil: mõõtelint tõmmatakse oksa kogupikkuses lahti ja loetakse, mitu sentimeetrit haaravad enda alla tallused. Tulemus väljendatakse osakaaluna kogupikkusest. (Hilmo & Holien, 2002; Will-Wolf *et al.*, 2002a). Katvust tüvedel määratakse kas kindlale kõrgusele asetatud prooviruudul või ümber tüve tõmmatud mõõdulindil (Cameron, 2002; Insarov, 2002; Will-Wolf *et al.*, 2002a). Samblike katvust maapinnal hinnatakse nii prooviruudu- kui ka transektimeetodil, millest eelistatum on viimane (Will-Wolf *et al.*, 2002a).

Katvust määratakse enamasti üldiste pikaajaliste kasvukeskkonda ja samblikukooslusi mõjutavate tegurite (õhusaaste, eutrofeerumise, metsaraie ja kliimamuutuste) mõju uurimiseks (Asta *et al.*, 2002). Eelkõige mõõdetakse indikaatorliikide katvust bioindikatsioonis (Zobel, 1988; Kricke & Loppi, 2002). Lisaks bioindikatsioonile on

metsasamblike katvust mõõdetud mitmetes ökoloogilistes töödes. Näiteks leiti Norras läbi viidud mitmeliigilisel uuringul, et servaepekt peegeldub metsas väga selgelt lehtja tallusega liikide hall hõlmasamblik *Platismatia glauca*, vagu-lapiksamblik *Parmelia sulcata*, toruhallsamblik *Hypogymnia tubulosa* ja *Cavernularia hultenii* katvuses (Hilmo & Holien, 2002). Ameerika Ühendriikides tehtud 176 metsas kasvava samblikuliigi ohtruste uuring näitas, et üleminekugradiendil mereliselt kliimalt mandrilisele toob temperatuuri tõus kaasa märgatava muutuse suursamblike koosluste struktuuris (McCune *et al.*, 1997). Lisaks kliima mõjule on uuritud ka metsa vanuse ja koosseisu mõju samblikukooslustele. Näiteks Kanadas läbi viidud töös leiti, et samblike ohtrus suureneb metsa vanusega ja jõuab platoole umbes 120-aastases metsas. Sealjuures jäänukpuud ei taga kõigi epifüütide püsijäämist (Price & Hochachka, 2000). Metsa vanus mõjutab katvust eelkõige levikumehhanismide kaudu – vana suur puu on olnud kauem kolonisatsioonile avatud, paljunemisstruktuurid jäävad suure tõenäosusega tema pragudesse pidama ja iseloomulik koorekeemia soodustab talluse kujunemist (Johansson & Ehrlén, 2003). Samblike katvust on mõõdetud ka kui faktorit, mis vähendab teiste liikide (näiteks limakute) liigirikkust (Schnittler & Stephenson, 2000).

3.3.1. Hinnang meetodile

Katvushinnang on kasvu mõõtmisest mõnevõrra universaalsem, sest vähemalt transektimeetodiga saab hinnata kõigi kasvuvormide katvust. Erinevates töödes saadud katvuste võrreldavus ja täpsus on küsitav, sest kuigi katvushinnang ei sõltu prooviruudu suurusest, on hinnang lõppkokkuvõttes siiski subjektiivne: tulemused mõõtjate vahel erinevad ja paratamatult ei ole alati võimalik üheselt määratleda talluse piirjooni (Will-Wolf *et al.*, 2002a, 2002b, 2004).

Katvuse mõõtmise head küljed on tema sobivus välitingimustesse, mittedestruktiivsus ja odavus. Töömahukuse tõttu ei peeta katvuse hindamist üldistes biomitmekesisuse uuringutes ja seireprogrammides kasutamiseks sobivaks (McCune & Lesica, 1992; Will-Wolf *et al.*, 2004).

4. TALLUSE FÜSIOLOOGIAL PÕHINEVAD MEETODID

4.1. ENERGEETILISE SEISUNDI HINDAMINE

Samblike energeetilise taseme säilitamises on olulised kaks põhilist protsessi: fotosüntees, mis toodab, ja hingamine, mis kulutab energiat. Samblike olemus tingib, et fotosünteesi viib läbi vaid fotobiont ja hingamises domineerib samblikus ülekaalus olev mükobiont. Sellest lähtuvalt peavad organismi püsiva elutegevuse kindlustamiseks olema samblikus tasakaalus fotosüntees, hingamine ning sümbiontide hulk (Palmqvist, 2000).

4.1.1. Samblike fotosünteesi efektiivsus

Samblike fotosüntees erineb oluliselt taimede kui peamiste fotosünteesiliste organismide omast. Esiteks ei ole samblikel lehelaadseid põhiliselt fotosünteesivatest rakkudest koosnevaid struktuure, vaid fotobiont on ümbritsetud seeneniidistikust (Green & Lange, 1995). Teiseks limiteerib mittenitritifitseerivatel samblikel klorofüllil ja seeläbi ka valgust siduvate komplekside hulka lämmastik, mis jõuab tallusesse ainult märg- või kuivdepositsioonil (Palmqvist, 2000). Kolmandaks määrab samblike poikilohüdriline iseloom nende võime fotosünteesida vaid küllaldase niiskusega perioodidel. Nendest punktidest järelduvalt on samblike netofotosüntees kuivmassi või pindala kohta juba olemuslikult väiksem kui taimedel (Palmqvist, 2000; tabel 2). Selle peamiseks põhjuseks ei ole aga mitte erinevused fotosünteesiprotsessis, vaid eelkõige samblike vähene klorofüllil sisaldus. Kui väljendada samblike netofotosünteesi kiirust klorofüllil sisalduse kohta, on samblike ja taimede vastavad väärtused väga lähedased (Green & Lange, 1995; tabel 3).

Põhilised fotosünteesi efektiivsust mõjutavad keskkonnategurid on vee, lämmastiku ning süsihappegaasiga varustus, valgustus ja temperatuur (Green & Lange, 1995; Nash, 1996b; Palmqvist, 2000). Soodsate keskkonnategurite mõju samblike fotosünteesile ei ole aga enamasti ühene. Oluline on tingimuste optimaalsus, sest fotosünteesi soodustava teguri mõju võib piirväärtust ületades olla vastupidine. Näiteks sümbiontse vetikaliigi *Trebouxia* puhul on tõestatud, et kõrge süsihappegaasi kontsentratsioon pärsib fotosünteesi (Palmqvist *et al.*, 1997; Palmqvist, 2000). Liiga intensiivne valguskiirgus mõjub fotobiondile veelgi otsesemalt, tekitades fotoinhibitsiooni¹⁰ (Palmqvist, 2000). Erinevatel samblikuliikidel

¹⁰ Fotoinhibitsioon – II fotosüsteemi aktiivsuse langus liigvalgusest tingitud kahjustuste tagajärjel (Björkman &

mõjutavad fotosünteesi efektiivsust samad tegurid, kuid optimaalsete tingimuste väärtused on erinevad. Näiteks rohevetikat *Trebouxia* sisaldavad samblikud suudavad fotosünteesida ka õhus veepotentsiaaliga miinus 10 MPa, kuid tsüanobakteri *Nostoc* puhul saab fotosüntees käivituda alles vedela veega niiskumisel. Teisalt on lisaks keskkonnategurite optimaalsusele oluline ka fotosünteesiliselt aktiivsete perioodide kestus ja sagedus. Kui tallus on aktiivne vaid lühikest aega ja harva, ei ületa süsiniku sidumine enam hingamist (Dahlman, 2003).

Tabel 2. Samblike ja taimede maksimaalse süsihappegaasi netoassimilatsiooni kiiruse võrdlus pindala ja kuivmassi kohta võrreldes taimedega (Green & Lange, 1995).

Organism	CO ₂ netoassimilatsiooni kiirus	
	pindalaühiku kohta (mg CO ₂ dm ⁻² h ⁻¹)	kuivmassi kohta (mg CO ₂ mg ⁻¹ h ⁻¹)
samblikud	0.5–2.0	0.3–5.0
C4 rohttaimed	30–80	60–140
C3 rohttaimed	20–45	30–60
heitlehelised puud	10–20	15–25
igihaljad puud	5–18	4–18
sõnajalad	3–5	
sammaltaimed	<3.0	0.6–3.5

Tabel 3. Samblike maksimaalne netofotosünteesi kiirus klorofüllis sisalduse kohta võrreldes soontaimedega (Green & Lange, 1995).

Organism	Netofotosüntees mg CO ₂ mg ⁻¹ Chl h ⁻¹
Soontaimed	
<i>Alnus glutinosa</i>	4.0
<i>Picea abies</i>	4.8
Samblikud	
<i>Pseudocyphellaria dissimilis</i>	5.6
<i>Parmelia capertata</i>	4.0
<i>Cladonia rangiformis</i>	1.5–3.0
<i>Peltigera praetextata</i>	18.5
<i>Umbilicariaceae</i>	0.26–1.01

Sisemistest teguritest mõjutavad süsiniku sidumise efektiivsust fotobiondi liigiomane fotosünteesivõimekus, sümbiontide süsinikuvajadus (Dahlman, 2003) ja osakaal, talluse suurus, vanus ning klorofüllis sisaldus (Palmqvist, 2000; Tretiach & Carpanelli, 1992). Fotosüntees ja hingamine kui membraansed protsessid sõltuvad ka sisemembraanide

terviklikkusest ja rakusisesest pH gradiendist (Gries, 1996). Eelkõige reguleerib fotobiondi hulka ja määrab fotosünteesi efektiivsuse talluse süsivesikuvajadus (Palmqvist, 2000), sest põhiline fotosünteesi efektiivsust langetav protsess – hingamine – toimub ka fotosünteesiks ebapiisavates niiskustingimustes (Green & Lange, 1995; Dahlman, 2003). Fotosünteesi efektiivsust mõjutavad väliskeskkonna tingimused ja osa sisekeskkonna omadustest on sambliku poolt kontrollimatud, kuid ometigi peab organism olema pidevalt varustatud elutegevuseks vajaliku energiaga. Seetõttu on oluline sobivates tingimustes kohandada füsioloogilisi protsesse ja siduda süsinikku võimalikult intensiivselt, et elada üle ka ebasoodne periood.

4.1.2. Fotosünteesi intensiivsuse hindamine

4.1.2.1. Klorofüllil fluorestsentsil põhinev fotosünteesi intensiivsuse mõõtmine

Sarnaselt teistele fotosünteesivatele organismidele suunatakse samblikes osa klorofüllil molekulides neeldunud valguskvantidest fotokeemilistesse reaktsioonidesse (Gries, 1996; Roger & Weiss, 2001). Klorofüllil fluorestsentsiks nimetatakse nähtust, kui sinise või punase valgusega ergastatud klorofüllil molekulid emiteerivad kaugpunase lainepikkusega footoneid, kusjuures energiatega vahe eraldub soojusena (Jensen, 2002). Fluorestsentsi põhjustavad ainult need kvandid, mis jäävad fotosünteesis kasutamata (Gries, 1996; Roger & Weiss, 2001). Seetõttu annavad klorofüllil fluorestsentsi parameetrid informatsiooni fotosünteesiapparaadi seisundi kohta (Jensen, 2002).

Klorofüllil fluorestsentsi mõõdetakse spetsiaalsete analüsaatoritega, mille üldnimetus on PAM (ingl k *Pulse Amplitude Modulated Fluorometer*). Enne mõõtmiste alustamist on olulised mitmed eeltööd: talluse niisutamine füsioloogilise aktiivsuse kindlustamiseks ja pimendamine, milleks kaetakse tallus pooleks tunniks näiteks sameti või fotograafias kasutatava valguskindla musta paberiga (Laisk & Eichelmann, 2001; Jensen & Kricke, 2002). Kui hinnatakse suurema arvu samblike seisundit välitingimustes, on aja kokkuhoiu mõttes soovitatav teha need ettevalmistused mõõtmisele eelneval õhtul (Jensen & Kricke, 2002). Mõned uurijad soovivad leida lühima pimeadaptatsiooni aja katsetades. Piisav võib olla ka vaid kümme minutit vältav pimendamine (Garty *et al.*, 2000, 2002b). Mõõtmisel esmalt pihustatakse tallusele vett ja liigest veesisaldusest tingitud näiliselt madalama aktiivsuse vältimiseks eemaldatakse tilgad kuivatuspaberiga. Seejärel kinnitatakse veel valguskindlalt kaetud tallusele muutumatus asendis mõõtmisi tagav klamber ning lõpuks ühendatakse fiiberoptilise valgusjuhtme otsad klambri ja mõõteinstrumendiga (Jensen, 2002;

Jensen & Kricke, 2002). Kui mõõdetakse ainult II fotosüsteemi maksimaalset efektiivsust pimeadapteeritud proovides (F_v/F_m)¹¹, piisab klambri paigalhoidmisest käega (Jensen & Kricke, 2002). Mugavam fikseerimisvõimalus on kasutada hiljuti samblike ja sammaltaimede seisundi hindamiseks välja töötatud statiivi ja kinnitada aparatuur talluse kohale (Schlensog & Schroeter, 2001). Samblike klorofüllü fluorestsentsi mõõtmisel on soovitatav sättida küllastava valguse tugevuseks 2000–4000 $\mu\text{mol footoneid} / \text{m}^2 \text{ s}$ ja kestuseks üks sekund, pideval valgusel aga vastavalt 50 või 100 $\mu\text{mol footoneid} / \text{m}^2 \text{ s}$ ning kestuseks kümme minutit. Sellised piirangud on vajalikud, sest tugevam valgus kui 4000 $\mu\text{mol footoneid} / \text{m}^2 \text{ s}$ võib kahjustada fotosünteesiaparaati ja seeläbi saadakse anomaaliad näiteks parameetri F_v/F_m mõõtmisel. Lisaks aparatuuri seadistusele on mõõtmisel oluline jälgida ka keskkonnatingimusi (Jensen & Kricke, 2002). Kõiki fluorestsentsiparameetreid mõjutab temperatuur, näiteks külmemates tingimustes võib saada tegelikust madalama maksimaalse emissiooni F_m väärtuse. Seetõttu on soovitatav paralleelselt fotosünteesiuuringutega mõõta ka õhutemperatuuri talluse kohal, eriti siis, kui võrreldakse paljusid tallusi või populatsioone (Smith & Gremmen, 2001; Jensen & Kricke, 2002).

Tüüpilised samblikel jälgitavad ning automaatselt mõõdetavad klorofüllü fluorestsentsi parameetrid on F_v/F_m , Φ_{PSII} ja NPQ. Iga näitaja informatiivsus oleneb uuringu eesmärkidest. Parimaks üldise vitaalsuse näitajaks peetakse pimeadapteeritud proovides mõõdetavat parameetrit F_v/F_m , mis väljendab II fotosüsteemi maksimaalset võimalikku efektiivsust ning korreleerub funktsionaalsete II fotosüsteemi reaktsioonitsentrite hulgaga (Calatayud *et al.*, 1996; Jensen & Kricke, 2002). F_v/F_m on parim varase stressi näitaja, sest selle väärtus reageerib ka keskkonnatingimuste halvenemisele, kui sambliku fotosünteesiaparaat on kahjustamata (Gauslaa *et al.*, 1996). Selle suhteliselt kiirelt ja lihtsalt mõõdetava näitaja normaalväärtus samblikel on vahemikus 0.6–0.76. Madalamad väärtused viitavad talluse kahjustustele (nt fotoinhibitsioonile) mitmesuguste keskkonnatingimuste (kuivuse, äärmuslike temperatuuride, liigvalguse) tagajärjel ja vähenenud kasvupotentsiaalile (Roger & Weiss, 2001; Jensen & Kricke, 2002). Kui see näitaja langeb aga madalamale kui 0.1, loetakse samblik surnuks. Erandiks on mõningaid koorikjaid, tsüanobakterist fotobiondiga ja sugukonna lapiksamblikulised *Parmeliaceae* liigid, kellel II fotosüsteemi maksimaalne efektiivsus ongi keskmisest madalam (0.5–0.6) (Gauslaa *et al.*, 1996; Jensen & Kricke, 2002). Teisest küljest on aga näiteks happevihma järel liigil *Cladonia cristatella* mõõdetud tavapäraseid ja saastunud õhuga aladel sambliku *Parmelia quercina* proovides keskmisest

¹¹ F_m – maksimaalne fluorestsentsi saagis, leitakse pimeadapteeritud proovi hetkeliselt valgusega ergastades; $F_v = F_m - F_0$, kus F_0 on fluorestsentsi emissiooni saagis madalas foonvalguses, kui kõik II fotosüsteemi tsentrid on avatud (Jensen, 2002)

veidi kõrgemaidki F_v/F_m tasemeid (Calatayud *et al.*, 1999; Bačkor & Fahselt; 2003). Parameetriga F_v/F_m soovitatakse kõrvutada Φ_{PSII} väärtust, mis väljendab II fotosüsteemi tegelikku efektiivsust valgustatud proovides. Kui uuritakse fotosünteesiga seotud stressinähte, on soovitatav F_v/F_m väärtuse asemel jälgida parameetrit NPQ. Mittefotokeemiline kustutaja NPQ väljendab soojusena eralduvat valgusenergiat ning annab fotoprotektsiooni ja fotoinhibitsiooni kohta täpsemat infot kui II fotosüsteemi maksimaalse võimaliku efektiivsuse mõõtmine (Jensen & Kricke, 2002). Erinevalt F_v/F_m mõõtmisest tuleb parameetrite Φ_{PSII} ja NPQ puhul arvestada sõltuvust ümbritsevast temperatuurist ja valguse intensiivsusest, kuid samas ei ole vajalik eelnev pimeadaptatsioon (Jensen, 2002).

Klorofüllü fluorestsentsi mõõtmine on väga populaarne meetod kõigi fotosünteesivate organismide seisundi hindamisel (Roger & Weiss, 2001; Jensen, 2002). Samblikel on see meetod sobiv uurimaks keskkonnatingimuste muutustega kohanemist pikema aja vältel. Näiteks Norras mõõdeti klorofüllü fluorestsentsi parameetreid F_v/F_m , Φ_{PSII} ja NPQ harilikul seinakorbal *Xanthoria parietina* ning leiti, et sambliku kohanemisevõime tagasid nii fotobiondi *Trebouxia* fotosünteesiapaaraadi omadused kui ka mükobiondi osalus fotoprotektsioonis, tootes tugevama kiirgusega perioodil rohkem kaitsvat pigmenti parietiini (Vrablikova *et al.*, 2006). Meetodi efektiivsust kinnitab ka Hispaanias tehtud katse, kus harilikul kopsusamblikul *Lobaria pulmonaria* tõestati parameetri F_v/F_m tundlikkus veestressile (Chakir & Jensen, 1999). Rootsis tehtud katsetes liikidega islandi käokõrv *Cetraria islandica*, harilik hallsamblik *Hypogymnia physodes*, harilik kopsusamblik *Lobaria pulmonaria* ning tähn-kilpsamblik *Peltigera aphthosa* kasutati vitaalsuse määramiseks klorofüllü fluorestsentsi parameetreid ja need osutusid ka talluse kasvu ja mikrokliimaga hästi korreleeruvaks (Palmqvist & Sundberg, 2000). Kuid sarnane hariliku kopsusamblikuga *Lobaria pulmonaria* tehtud transplantatsioonikatse Norras näitas, et parameeter F_v/F_m väljendab vaid hiljutist kahjustust ega ole informatiivne krooniliste kahjustuste puhul (Gauslaa & Solhaug, 2000). Ükski klorofüllü fluorestsentsi parameeter ei ole universaalne vitaalsusindikaator, sest informatiivsus varieerub sõltuvalt katse ülesehitusest.

4.1.2.2. Klorofüllü sisalduse määramine

Klorofüllü sisaldus on põhiline samblike fotosünteesi limiteeriv ja seeläbi vitaalsust mõjutav faktor (Green & Lange, 1995). See on keskkonnale tundlik füsioloogiline tunnus, mis annab kahjustustest märku enne kasvu ja morfoloogia muutusi. Enim määratud näitajad on klorofüllü a, klorofüllü b ja kogu klorofüllü hulk ning õhusaaste hindamisel lisaks klorofüllü–

feofütiini¹² suhe. Siiski tuleb arvestada, et kõigil samblikuliikidel ei esinegi klorofüllil b (Brown, 1980).

Kuna klorofüllil sisalduses on märgatavad looduslikud erinevused, soovitatakse võtta proovid massiga umbes 20 milligrammi vähemalt viies korduses ja samal kaugusel talluseservast seda kaasamata (Boonpragob, 2002; Gauslaa *et al.*, 1996). Pigmentid tuleks eraldada esimesel võimalusel ja säilitada ekstrakti analüüsimiseni külmas (Gonzalez, 2001). Pigmentid vabastatakse materjalist atsetooni või dimetüülsulfoksiidiga, mis lõhuvad kloroplastide membraani. Ekstraheerimiseks hoitakse segu tavaliselt 40–45 minutit pimeduses 60–65 °C juures, kuid üksikutes töodes peetakse piisavaks ka 30 minutit 40 °C juures (Calatayud *et al.*, 1996; Boonpragob, 2002; Palmqvist *et al.*, 2002; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004b). Pigmentide ekstraheerimise protsess on väga tundlik. Sekundaarsed samblikuained võivad näiteks põhjustada klorofüllil lagunemist, mistõttu tuleb kasutada liike, kellel need puuduvad, või eemaldada samblikuained eelnevalt atsetooniga pestes (Boonpragob, 2002). Samuti võib tulemuste täpsust mõjutada ekstraheerimisegu koostis. Näiteks metanool põhjustab klorofüllil oksüdeerumist ja spektri nihkumist madalama lainepikkusega aladele, mistõttu pigmentide eraldamiseks on soovitatav kasutada pigem dimetüülsulfoksiidi või atsetooni (Gonzalez, 2001; Brown, 1980). Klorofüllil stabiilsust tõstab polüvinüülpolüüpürolidooni või Na₂CO₃ lisamine (Beekley & Hoffman, 1981; Bačkor & Fahselt, 2003). Ekstraheeritud pigmentide hulka määratakse spektrofotomeetriliselt, mõõtes lahuse optilist tihedust lainepikkustel 648 ja 665 nm või 645 ja 663 nm (Tretiach & Carpanelli, 1992; Boonpragob, 2002). Vastavalt valguse neeldumisele (OD) kindlal lainepikkusel arvutatakse klorofüllil sisaldused milligrammides liitri kohta. Selleks kasutatakse järgnevat kahte valemikomplekti, mis on mõeldud vastavalt dimetüülsulfoksiidi (mõõtmised tehakse lainepikkustel 648 ja 665 nm) ja atsetooni (mõõtmised tehakse lainepikkustel 645 ja 663 nm) lahusele:

$$\begin{array}{ll} \text{Chl}_{a+b} = 20.34 \text{ OD}_{648} + 7.49 \text{ OD}_{665} & \text{Chl}_{a+b} = 20.21 \text{ OD}_{645} + 8.02 \text{ OD}_{663} \\ \text{Chl a} = 14.85 \text{ OD}_{665} - 5.14 \text{ OD}_{648} & \text{Chl a} = 12.72 \text{ OD}_{663} - 2.69 \text{ OD}_{645} \\ \text{Chl b} = 25.48 \text{ OD}_{648} - 7.36 \text{ OD}_{665} & \text{Chl b} = 22.87 \text{ OD}_{645} - 4.68 \text{ OD}_{663} \end{array}$$

Lõpuks väljendatakse pigmentide sisaldus milligrammides kuivmassi kohta (Tretiach & Carpanelli, 1992; Fahselt *et al.*, 2001; Boonpragob, 2002).

¹² feofütiin – hapete toimele klorofüllil molekulist Mg²⁺ eraldumisel tekkiv pruun fluorestseerumatu ühend (Miidla, 1984b)

Klorofüllü sisaldus on suhteliselt levinud vitaalsuse indikaator. Rootsi ja Poola lihhenoloogide katsed näitavad, et hariliku kopsusamblikul *Lobaria pulmonaria* osutavad seisundi muutusele samaväärselt nii klorofüllü a kontsentratsioon kui ka klorofüllide a ja b suhe, ning konstantsetes tingimustes need näitajad oluliselt ei muutu (Gauslaa & Solhaug, 2000; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004b). Samuti vastab hariliku kopsusambliku fotosünteesipigmentide sisaldus sujuvalt aastaaegade vaheldumisele, mis viitab, et klorofüllü sisalduse muutmine on samblikel oluline aklimatsioonimehhanism (Schofield *et al.*, 2003). Liigil harilik kitsesamblik *Parmelia caperata* on mõõdetud klorofüllü sisaldust paralleelselt maksimaalse netofotosünteesi ja hingamisega. Selle tulemusena selgus, et klorofüllü sisaldus osutab väga hästi erinevatele arengufaasidele, olles väike soredidega kaetud ning suur kasvavates tallusepiirkondades (Tretiach & Carpanelli, 1992).

4.1.2.3. Hinnang meetoditele

Klorofüllü fluorestsentsi mõõtmise eelisteks on rakendatavus välitingimustes, suur täpsus, lihtsus, kiirus ja informatiivsus (Jensen & Kricke, 2002). Meetod ei ole destruktiivne ja seda saab kasutada kõigil kasvuvormidel. Aparatuuri olemasolul ei kaasne klorofüllü fluorestsentsi mõõtmisega ka märkimisväärsed edasisi kulutusi. Ka klorofüllü hulga määramine on tundlik ja suhteliselt lihtne. Ent erinevalt fluorestsentsi mõõtmisest on see destruktiivne meetod, mille puhul laboritöö on vältimatu. Lisaks on mitmeid rakenduslikke piiranguid: fotosünteesipigmentide hulka kuivmassi kohta ei saa määrata koorikjatel ja ei ole soovitatav mõõta samblikuaineid sisaldavatel liikidel (Boonpragob, 2002). Täpsete tulemuste saamiseks peab reaktsioonitingimusi hoolsalt kontrollima, sest klorofüll on äärmiselt lagunemisaldis (Brown, 1980). Nii klorofüllü fluorestsentsi kui ka kontsentratsiooni mõõtmiste suur puudus on ühekülsus – hinnata on võimalik vaid fotobiondi seisundit (Jensen & Kricke, 2002).

4.1.3. Hingamise intensiivsuse mõõtmine

Fotosünteesi intensiivsuse väärtuste suurema informatiivsuse tagamiseks tuleks need kõrvutada samblikes toimuva vastandliku protsessi – hingamisega, milles osaleb ka mükobiont. Hingamine mõjutab energeetilist seisundit samblikel teravamalt kui taimedel, sest hingamises domineeriv seenkomponent ise ei fotosünteesi. Siiski, keskmiselt hingavad samblikud 20 °C juures intensiivsusega 1–3 milligrammi süsihappegaasi grammi kuivmassi kohta tunnis, mis ei erine suurel määral vastavatest väärtustest taimedel (Green & Lange,

1995). Energeetiliselt koormavamaks muutub hingamine mitmesuguste keskkonnatingimuste muutudes. Olulisim hingamise intensiivsust mõjutav tegur on temperatuur. Keskkonna soojenemisel 10 °C võrra intensivistub hingamine kaks kuni kolm korda (Nash, 1996b; Palmqvist, 2000). Hingamine toimub ka siis, kui fotosünteesi käivitumiseks veel niiskust ei piisa ja sarnaselt temperatuuri mõjuga suureneb talluse veesisalduse tõustes. 22% veesisalduse juures on samblikel vee kompensatsiooni punkt, kus fotosüntees on piisav, et tasakaalustada hingamine. Suurematel veesisaldustel on ülekaalus süsihappegaasi sidumine (Nash, 1996b). Gaasivahetus on tihedalt seotud ka metaboolsete protsessidega talluses. Näiteks suuremal lämmastiku sisaldusel on ka hingamine intensiivsem, sest valkude anabolism on energiamahukas protsess (Green & Lange, 1995; Dahlman, 2003). Kõrge klorofüll- ja lämmastiku sisaldusega samblikuliigid hingavad intensiivsemalt (Palmqvist *et al.*, 2002).

Levinuim on gaasivahetuse mõõtmine suletud süsteemis. Selleks suletakse niisutatud samblik minutiteks küvetti ja infrapuna-analüsaator mõõdab muutusi süsihappegaasi kontsentratsioonis, mis lõpptulemuses väljendatakse talluse kuivmassi kohta. Mõõtmise vältel hoitakse õhuniiskus ja temperatuur kambris võimalikult konstantsed (Nash, 1996b; Deltero *et al.*, 1999). Täpsete tulemuste saamiseks on soovitatav mõõteküvetti sisenev õhk eelnevalt kuivatada, sest süsihappegaas ja veeaur neelavad samaväärselt infrapunast valgust. Et vältida fotosünteesi segavat toimet, tuleb mõõtmised teha pimeduses (Tamayo *et al.*, 2001). Vähekasutatud alternatiiv süsihappegaasi muutuste mõõtmisele on hapnikul põhinev analüüsisüsteem (Jensen, 2002).

Süsihappegaasivahetust on mõõdetud tuustsamblikel *Alectoria* ja narmassamblikel *Bryoria*, et seletada nende erinevaid kasvuvööndeid võrastikus. Kaks aastat väldanud uurimus selgitas välja, et sõltuvalt mikrokliima ja füsioloogia erinevustest saavutavad tuustsamblikud maksimaalse netofotosünteesi ja kasvu madalamal positsioonil võras. Narmassamblike kõrge positsiooni tingib aga nende tundlikkus pika hüdratatsiooniperioodi suhtes (Coxson & Coyle, 2003). Katsetes kandsamblikuga *Dictyonema glabratum* leiti, et hingamine osaleb homeostaasis temperatuuriga kohanemisel (Larcher & Vareschi, 1988).

4.1.3.1. Hinnang meetodile

Samblike hingamise mõõtmine on destrukttiivne laborimeetod, mis vajab spetsiaalset aparatuuri. Teise rakendusliku piiranguna ei ole mõõtmine võimalik koorikjatel liikidel (Jensen, 2002). Vaatamata täiustuvale metoodikale on gaasivahetuse mõõtmine samblikel

tunduvalt keerukam kui taimedel. Esiteks ei ole võimalik väljendada samblike gaasivahetust pindala kohta, sest talluse pind on pidevas muutumises niiskumise ja kuivamise tsüklite tõttu. Lisaks sellele varieeruvad hingamise väärtused tugevalt talluse erinevates piirkondades. Näiteks liikidel alpi põdrasamblik *Cladina stellaris* ja harilik põdrasamblik *Cladina rangiferina* on mõõdetud tipmistes osades kümme korda intensiivsem hingamine kui alumistes piirkondades (Nash, 1996b). Hingamine üksi ei ole hea vitaalsuse näitaja, sest see on väga varieeruv nii ühe talluse piires kui ka sõltuvalt keskkonnast. Enamasti mõõdetakse hingamist osana netofotosünteesiuuringutest.

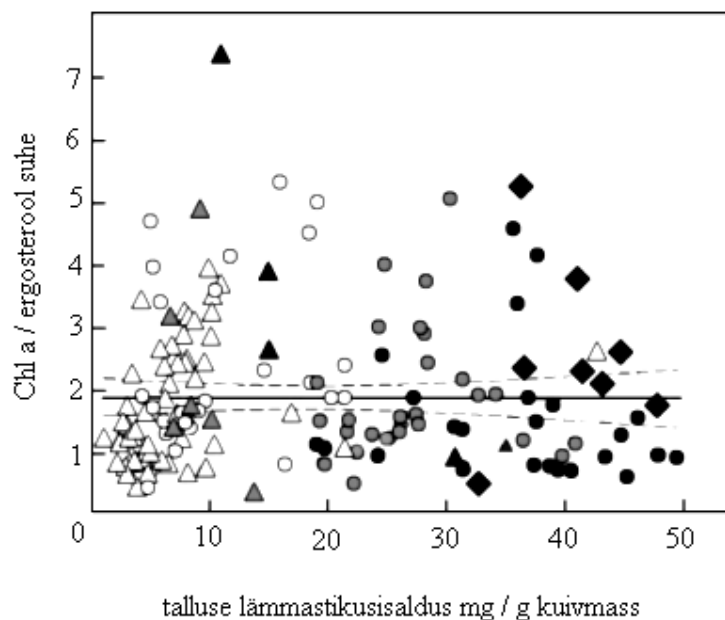
4.1.4. Sümbiontide osakaalu hindamine

Et sümbiondid saaksid toimida ühise organismina, peab samblikus olema energia tarbimine ja tootmine tasakaalus. Energia salvestamises osaleb aga vaid fotobiont ja fikseeritud süsinikku kulutab põhiliselt seenkomponent. Seega sambliku püsijäämiseks peab foto- ja mükobiondi hulk olema tasakaalus, kusjuures fotobiondi hulga määrab mükobiondi kui põhilise tarbija energiavajadus (Palmqvist, 2000).

Tasakaaluseisundi määramiseks, lisaks tallusekihtide paksuse mõõtmisele, on kaks lähenemisviisi. Esiteks on võimalik hinnata sümbiontide hulka spetsiifiliste markerite alusel (Larcher & Vareschi, 1988; Dahlman, 2003). Fotobiondi hulga hindamiseks mõõdetakse klorofüllil a või ensüüm ribuloos-1,5-bifosfaat-karboksülaasi ehk rubisco kontsentratsiooni (Dahlman, 2003; Sundberg *et al.*, 2001). Mükobiondi osakaalu hindamiseks mõõdetakse ergosterooli või kitiini hulka. Ergosterool on seente plasmamembraani põhikomponent, mis väljendab aktiivse koe kogust. Kuna nimetatud sterool on valgusele väga tundlik, on tegu ka sobiva markeriga mükobiondi kahjustuste hindamiseks (Dahlman, 2003). Kitiin on N-atsetüülglükoosamiini polümeer, lämmastikurohke seente rakuseina komponent, mida kasutatakse mükobiondi biomassi hindamiseks (Sundberg *et al.*, 2001; Dahlman, 2003).

Teiseks väljendab sümbiontide vahelist tasakaalu süsiniku ja lämmastiku suhe talluses. Lämmastikku on samblikus pidevalt vaja näiteks valkude, nukleiin- ja aminohapete sünteesiks ning mükobiondi rakuseina ülesehitamiseks, et kasvada ja suurendada valgust ja mineraalaineid vastuvõtvat pinda (Palmqvist *et al.*, 2002). Kuid samas tuleb lämmastikku investeerida ka fotosünteesiaparaadi sünteesiks, et varustada organismi kasvuks, hingamiseks ja anabolismiks vajaliku süsinikuga. Lämmastiku ja süsiniku hulk peab olema tasakaalus, sest suurematel lämmastiku kontsentratsioonidel intensiivistub ka hingamine

(Sundberg *et al.*, 2001). Lisaks sellele on ühenditesse sidumata NH_4^+ kõrge tase toksilise toimega (Dahlman *et al.*, 2003). Lähtuvalt sümbiondiliikide erinevast energiatarbest ja talluse morfoloogiast on optimaalne süsiniku-lämmastiku ja fotobiondi-mükobiondi suhe samblike liigiomane tunnus, mida püütakse säilitada sõltumata muutustest lämmastiku depositsioonis (Palmqvist *et al.*, 2002; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004a; joonis 5).



Joonis 5. Sümbiontide osakaalu (klorofüll a ja ergosterooli suhe) ning talluse lämmastiku sisalduse seos 70 samblikuliigil. Tähistused: valge – fotobiont rohevetikas; hall – fotobiondid rohevetikast ja tsüanobakter; must – fotobiont tsüanobakter; ringid – koorikjas tallus; kolmnurgad – põõsasjas tallus; romboidid – homöomeerne tallus (Dahlman, 2003 järgi).

Seene ja fotosünteesiva komponendi hulga hindamiseks samblikes on välja töötatud mitmeid laborimeetodeid, mis põhinevad sümbiondi-spetsiifilistel ühenditel. Fotobiondi-spetsiifilised markerid on klorofüll a ja ensüüm rubisco hulk. Klorofüll a ekstraheeritakse samblikest tavaliselt dimetüülsulfoksiidiga, nagu eelnevalt kirjeldatud (ptk 4.1.2.2.). Rubisco analüüsiks tehakse võrdse massiga proovides (umbes 25 mg) sisalduvate valkude geelelektroforees ja mõõdetakse 55-kilodaltonilise molekulmassiga bändi tihedus lainepikkusel 55 nm (Sundberg *et al.*, 2001). Mükobiondi-spetsiifilised markerid on ergosterooli ja kitiini hulk. Ergosterooli eraldamiseks lõhutakse membraanid 99.5% etanooliga. Aine kogus määratakse metanoolitöötuse järel kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (HPLC), mis määrab

neeldumise ergosteroolile omasel lainepikkusel 280 nm. Kitiini eraldamiseks töödeldakse rakud esmalt NaOH-ga, et vabaneda valkudest ja aminohapetest. Seejärel viiakse läbi happeline hüdroolüüs soolhappega, mille tulemusena kitiin laguneb glükoosamiini jääkideks. Need töödeldakse 9-fluorenüülmetüülkloroformaadiga fluorestseerivateks ühenditeks, mida saab kromatograafiliselt edasi analüüsida (Palmqvist *et al.*, 2002). Mükobiondi-spetsiifilisi markereid soovitatakse mõõta koos, sest kitiini ja ergosterooli suhe võimaldab hinnata metaboolset inaktiivse seene biomassi (Dahlman, 2003). Sellise uuringu puhul eraldatakse kitiin ergosterooli analüüsi jääkidest (Gaio-Oliveira *et al.*, 2004b). Süsinikku ja lämmastikku määratakse kümnmilligrammistes kuivatatud proovides CHN-elementanalüsaatoriga (Palmqvist *et al.*, 2002).

Sümbiontide osakaalu mõõtmist on kasutatud hariliku kopsusambliku *Lobaria pulmonaria* populatsioonide võrdlemiseks Rootsis ja Portugalis. Keskkonnatingimustega kohanemine transplantatsiooni järel peegeldus sümbiontide osakaalus. Näiteks avatud kasvukohast pärit talluse paigutamisel halvematesse valgustingimustesse kujunes kolme kuuga klorofüllilise sisaldus esialgsest kaks korda suuremaks (Gaio-Oliveira *et al.*, 2004b). Sümbiontide-spetsiifilisi markereid on mõõdetud ka koos süsiniku ja lämmastiku kontsentratsiooniga. Ühes taolises uuringus selgus, et samblikud püüavad hoida konstantset fotobiondi rakkude ja metaboolset aktiivse seenekoe suhet. Selle saavutamiseks investeeritakse lämmastikku kas pigem fotobionti või mükobionti, et süsiniku tootmine vastaks hingamisvajadusele (Palmqvist *et al.*, 2002).

4.1.4.1. Hinnang meetodile

Sümbiontide osakaalu hinnates saab väärtuslikku ja väga täpset informatsiooni samblike suhetest keskkonnaga. Selle meetodi teoreetilist tausta just viimastel aastatel väga põhjalikult uuritud paljudel erinevatel liikidel (Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman, 2003). Kuid rutiinseks seisundi hindamise viisiks on foto- ja mükobiondi hulga määramine ebamugav. Meetod on destrukttiivne, eeldab proovide kogumist ning analüüsi laboris. Selleks omakorda on vajalikud mitmed seadmed ja spetsiifilised kemikaalid.

4.2. STRESSIAINETE ANALÜÜS

Samblikes on leitud mitmeid ühendeid, mille kontsentratsioon stressiseisundis (õhusaaste, pikaajaline veestress) tõuseb märgatavalt. Need on ühendid, mis tagavad kaitseprotsessid ja võimaldavad organismil kohaneda raskemate tingimustega. Kui taimede stressihormoone on palju uuritud, siis sarnaste ühendite kohta samblikes on äärmiselt vähe infot (Ott, 2002). Enim uuritud ühendid, mida seostatakse samblike stressikindlusega, on etüleen, abstsissihape ning antioksidandid superoksiidi dismutaas ja glutatiooni reduktaas.

4.2.1. Etüleeni tootmise mõõtmine

Etüleen on gaasiline süsivesinik, mida toodetakse samblikus madalal tasemel pidevalt (Garty *et al.*, 2003). Etüleeni produktsiooni suurenemine viitab üldisele talluse stressile ja vitaalsuse langusele olemata foto- või mükobiondispetsiifiline (Garty *et al.*, 2002b). Kuna viimase kümne aasta uuringud etüleeni seostest samblike vitaalsusega piirduvad põhiliselt kahe töörühma (eesotsas Jacob Garty ning Sieglinde Ott) ja väheste liikidega, on selle ühendi täpsemast funktsioonist samblikes väga vähe infot (Ott, 2002). Teatakse, et etüleeni produktsioon sõltub temperatuurist ja talluse veesisaldusest ning on väiksem valgusküllaste kasvukohtade samblikel. Selle ühendi tootmine mõjutab talluse arengut ja korreleerub eriti hästi fotobiondi kasvufaasidega (Garty *et al.*, 1997, 2000; Ott, 2002).

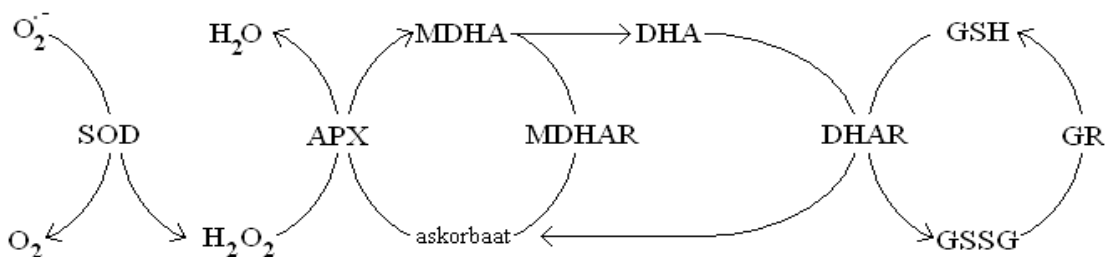
Etüleeni produktsiooni määratakse umbes ühemilligrammistest proovidest, mille kogumisel püütakse jätta võimalikult vähe lõikeservi, sest talluse vigastamine võib samuti põhjustada selle ühendi taseme tõusu. Proove leotatakse esmalt destilleeritud vees pool tundi. Seejärel eemaldatakse liigne vesi filterpaberiga ja suletakse tallus kolmeks tunniks 50-milliliitrisse kolbi. Selle aja vältel eraldub samblikust gaasiline etüleen. Etüleeni koguse hindamiseks tõmmatakse kolbist määratud aja möödumisel neli milliliitrit gaasi, millest veerand analüüsitakse gaaskromatograafiliselt (Garty *et al.*, 2000). Parema ülevaate saamiseks on soovitatav esimestel proovidel gaasi tootmist mõõta korduvalt pikema aja vältel. Nimelt on etüleeni produktsioon ajas mittelineaarne ja küllastuspunkti saavumine varieerub (Ott, 2002).

Senised etüleeni tootmise mõõtmised samblikel on tehtud saastunud õhuga piirkondades põhiliselt perekonna rihmsamblikud *Ramalina* liikidega (Garty *et al.*, 1997, 2000, 2002b, 2003). Nende uuringute eesmärk on pigem teoreetilise tagapõhja täiendamine ja võimaliku

indikaatortunnuse katsetamine. Kui teadmised etüleenitootmisest laieneksid, võiks sellest saada samblike üldise vitaalsuse hindamise meetod.

4.2.2. Superoksiidi dismutaasi ja glutatiooni reduktaasi aktiivsuse mõõtmine

Superoksiidi dismutaaside rühm (SOD) ja glutatiooni reduktaas (GR) on reaktiivseid hapnikuühendeid¹³ kahjutustavad ensüümid. Superoksiidi dismutaas paikneb askorbaadi-glutatiooni raja alguses ja konverteerib superoksiid-radikaale vesinikperoksiidiks. Glutatiooni reduktaas paikneb sama raja lõpus ning katalüüsib oksüdeeritud glutatiooni muutmist glutatiooniks (Thomas, 2002; joonis 6). Samblikes moodustavad antioksidatiivsed ensüümid eelkõige olulise osa kuivamiskindluse saavutamiseks vajalikest mehhanismidest (Kranter *et al.*, 2003; Minibayeva & Beckett, 2001; Beckett *et al.*, 2005). Kui fotosünteesi toimumiseks ei ole talluses piisavalt vett, kuid elektronide voog klorofüllimolekulidelt jätkub, moodustub hapnikust superoksiidradikaal, mis on aluseks teistele reaktiivsetele hapnikuühenditele (Kranter *et al.*, 2003). Kui antioksidatiivsed ensüümid ei suuda tekkinud reaktiivseid hapnikuühendeid piisavalt kiiresti ümber töödelda, järgnevad rakukahjustused ja kiire vitaalsuse langus. Samblike vastupanuvõimest stressitingimustele annab infot superoksiidi dismutaasi ja glutatiooni reduktaasi aktiivsuse mõõtmine.



Joonis 6. Glutatiooni-askorbaadirada superoksiidradikaali kahjutustamiseks. Lühendite tähised: SOD – superoksiidi dismutaas; APX – askorbaadi peroksidaas; MDHA – monodehüdroaskorbaat; MDHAR – monodehüdroaskorbaadi reduktaas; DHA – dehüdroaskorbaat; DHAR – dehüdroaskorbaadi reduktaas; GSH – redutseeritud glutatioon; GSSG – oksüdeeritud glutatioon (glutatioon disulfiid); GR – glutatiooni reduktaas (Tohver, 1977; Thomas, 2002).

¹³ reaktiivsed hapnikuühendid (ROS) – paardumata elektroni sisaldavad hapnikuühendid, mis kahjustavad DNA-d, valke ja lipiide. Reaktiivsed hapnikuühendid tekivad normaalse metabolismi käigus kloroplastides, mitokondrites ja peroksisoomides ning neid kahjutustavad ensümaatilised (superoksiidi dismutaas, glutatiooni reduktaas) või mitteensümaatilised (glutatioon, askorbaat) antioksidandid. Nende hulk organismis suureneb biootilise või abiootilise stressi tingimustes (Thomas, 2002; Apel & Hirt, 2004)

Proovid, milles ensüümide aktiivsust mõõdetakse, purustatakse vedelas lämmastikus ning saadud pulbrile lisatakse fosfaatpuhtrit ja valkude stabiilsuse tagamiseks ka proteaasi inhibiitorit. Järgnevates protsessides valgud sadestatakse ning suspendeeritakse puhvris. Seejärel antioksidatiivsete ensüümide aktiivsuse mõõtmise meetodika lahkneb. Glutatiooni reduktaasi aktiivsust mõõdetakse spektrofotomeetriliselt proovi, vett, NADPH-lahust, puhtrit ja ensüümi substraati glutatioon disulfiidi sisaldavas küvetis. Reaktsiooni käigus on NADPH elektronide doonoriks ja ühendi oksüdeerudes glutatiooni reduktaasi toime väheneb lahuse neeldumine lainepikkusel 340 nm. Ensüümi aktiivsuse arvutamiseks registreeritakse spektrofotomeetri näit iga 30 sekundi järel 10–15 minuti vältel. Saadud lineaarsest sõltuvusest arvutatakse Lambert-Beer'i seaduse järgi glutatiooni reduktaasi aktiivsus. Lõpptulemus väljendatakse tavaliselt kuivkaalu või valgusisalduse kohta. Ka superoksiidi dismutaasi aktiivsust mõõdetakse spektrofotomeetriliselt. Selle ensüümi aktiivsust väljendab lahuses spontaanse formasiini tekkereaktsiooni inhibeerimise kiirus, mida mõõdetakse lainepikkusel 560 nm. Kuna see reaktsioon on mittelineaarne, arvutatakse tulemused kontrollküveti andmeid kaasates. Superoksiidi dismutaasi aktiivsus väljendatakse tavaliselt valgusisalduse kohta (Thomas, 2002).

Katsetega on leitud, et glutatiooni reduktaasi aktiivsus korreleerub hästi liikide kuivamistolerantsusega. Vastupidavama halli karesambliku *Pseudevernia furfuracea* glutatiooni reduktaas oli aktiivsem ja saavutas ka maksimumväärtuse kiiremini kui tundlikumal harilikul kopsusamblikul *Lobaria pulmonaria* (Kranner, 2002). Lamedal rihmsamblikul *Ramalina lacera* mõõdeti analoogilises katses kuivamisele järgneva niiskumise järel nii glutatiooni reduktaasi kui ka ensüüm superoksiidi dismutaasi kõigi vormide aktiivsuse tõus (Weissman, 2005).

4.2.3. Abstsiihappe sisalduse mõõtmine

Abstsiihape (ABA) on terpenoid, mida on leitud mõlemast sümbiondist ja ka tsüanobakterist fotobiondiga liikidest (Miidla, 1984a; Dietz & Hartung, 1999). Oletatakse, et põhiline abstsiihappe tootja samblikus on siiski seen. Selle ühendi sünteesi indutseerib kuivanud talluse niiskumine. Abstsiihappe süntees ei sõltu siiski vee olemasolust, vaid seda ühendit toodetakse äsja niiskunud talluses, et taastada metabolism ja valmistuda järgmiseks kuivamisperioodiks (Dietz & Hartung, 1998). On tõestatud, et kõrgel temperatuuril tõkestab abstsiihape fotosünteesi pärssumist ja kuivamisele järgneval niiskumisel indutseerib signaaliülekanne rajad, mis suurendavad samblikus eelkõige fotobiondi vastupidavust veepuudusele (Dietz & Hartung, 1999; Beckett *et al.*, 2005).

Abstsiishapet eraldatakse kuivatatud ja vedelas lämmastikus homogeniseeritud tallusest 80% metanooliga temperatuuril -18°C . Ekstraheerumine kestab vähemalt ööpäeva. Ühendi kontsentratsioon leitakse immunoloogiliselt, kasutades immobiliseeritud biosüsteemi ELISA, mis põhineb ensüümi antigeenina äratundvatel monoklonaalsetel antikehadel. Lõpptulemus väljendatakse pikomoolides talluse kuivmassi kohta (Dietz & Hartung, 1998).

Abstsiishapet on leitud paljudes samblikuliikides olenemata nende kasvuvormist ja fotobiondi liigist. Tõestatud on selle ühendi mitmeid üllatavaid funktsioone lisaks kuivamiskindluse tagamisele. Näiteks liikidel harilik hallsamblik *Hypogymnia physodes*, harilik seinakorp *Xanthoria parietina* ja jalami-kilpsamblik *Peltigera praetextata* leiti abstsiishappe leevendav mõju tundlikkusele veega üleküllastatuse suhtes (Dietz & Hartung, 1999). Tsüanobakterist fotobiondiga liigil *Peltigera polydactylon* kirjeldati, et abstsiishape toimel oli äsja niiskunud talluses hingamise tõus neljandiku võrra väiksem, see aga vähendas süsinikukadusid (Beckett *et al.*, 2005). Samuti on kirjeldatud abstsiishappesisalduse suurt varieeruvust nii ühe liigi kui ka indiviidi piires. Oletatavasti on põhjuseks see, et foto- ja mükobiont ei ole ka ühes talluses geneetiliselt homogeensed (Dietz & Hartung, 1998).

4.2.4. Hinnang meetoditele

Eelpool nimetatud stressiainete füsioloogilist tagapõhja on veel liialt vähe uuritud, et nende alusel saaks samblike seisundit hinnata võrdväärselt teiste meetoditega. Ühendite analüüs on liialt laborikeskne, vajades mitmesuguseid seadmeid ja kemikaale. Etüleen-i produktsiooni mõõtmisel on puuduseks ka suure hulga paralleelsete proovide (15–20) kogumise nõue (Ott, 2002).

5. ARUTELU

Käesoleva töö eesmärgiks oli hinnata metsasamblike seisundi määramise meetodeid ja nende vastavust püstitatud tingimustele: universaalsusele, täpsusele, mittedestruktiivsusele, sobivusele välitingimustesse ja optimaalsele kulukusele. Meetodeid analüüsiti nende kriteeriumitele tuginedes vastavate peatükkide lõpus ning antud hinnangud on kokkuvõtvalt koondatud tabelisse 4.

Tabel 4. Metsasamblike seisundi hindamise meetodite vastavus nõutud tunnustele. Tähisted: [+] – meetod vastab kriteeriumile; [–] – meetod ei vasta kriteeriumile; [?] – vähese uurituse tõttu ei ole teada, kas meetod vastab kriteeriumile; [*] – analüüsitud on meetodite gruppi.

	universaalne sobib samamoodi paljudele liikidele ja kasvuvormidele	täpne tulemus	mittedestruktiivne	sobib välitingimustesse	optimaalselt kulukas
talluse anomaaliate vaatlemine	–	–	+	+	+
paljunemisstruktuuride ohtruse hindamine*	–	?	+	+	+
anatomiliste tunnuste vaatlemine mikroskoobiga*	+	+	–	–	+
talluse kasvu mõõtmine*	–	–	+	+	+
katvuse määramine	–	–	+	+	+
klorofüllü fluorestsentsi mõõtmine	+	+	+	+	+
klorofüllü sisalduse määramine	–	+	–	–	–
hingamise intensiivsuse mõõtmine	+	–	–	–	+
sümbiontide osakaalu hindamine	+	+	–	–	–
stressiainete analüüs	+	?	–	–	–

Tulemuste koondtabelist selgub, et esitatud tingimustele vastab kõige paremini klorofüllü fluorestsentsi mõõtmine. Sobivuselt järgnevate meetodite – talluse kasvu ja katvuse mõõtmise ja paljunemisstruktuuride ohtruse hindamise – puuduseks on vähene täpsus ja universaalsus kasvuvormiti. Ainus piisavalt hea destruktiivne meetod on anatomiliste tunnuste vaatlemine mikroskoobiga. Enamikele kriteeriumitele vastav paljunemisstruktuuride ohtruse hindamine ei ole aga eelnevalt nimetatutega samaväärne. Nimelt määratakse paljunemisstruktuuride ohtrust ka kahemõõtmelisel tallusel, mispuhul on tegu destruktiivse meetodiga. Paraku tulebki välitingimustes kasutatava meetodi valimisel

enamasti ohverdada tulemuste täpsus. Nimelt laborimeetoditega saab paremini märgata erinevusi sarnase konditsiooniga talluste vahel. Seega parema tulemuse ja samas lihtsuse nimel tuleks uuringutes kombineerida analüüse välitingimustes ja laboris.

Antud töös tähtsustati meetodite puhul nende rakendatavust välitingimustes. See kriteerium mõjutas oluliselt ka parimate meetodite koosseisu, sest laborianalüüsi eeldavad meetodid on paratamatult ka destruktiivsed, sest eeldavad proovide kaasa kogumist. Meetodite sobivust välitingimustesse ei tohiks siiski üle tähtsustada. Iga üksik laborimeetod ei vaja ju reeglina tervet laborisisustust, vaid piiratud hulgal seadmeid ja keemilisi ühendeid kindla analüüsi läbiviimiseks. Näiteks mikroskopeerimisvahendid on kergesti teisaldatavad ja nõuavad vähe ruumi. Vastavalt varustatud välibaasi olemasolul on võimalik proove koguda ja analüüsida samal päeval uuringualade läheduses.

Parima meetodi valimisel tuleb esmajoones lähtuda siiski konkreetse uuringu eesmärgist. Näiteks haruldase liigi populatsioonide seisundi hindamisel tuleks tallusele kahjutut välimeetodit eelistada destruktiivsele ent täpsele laborianalüüsile, mis eeldab suure hulga proovide kogumist. Sealjuures tuleks aga lisaks välistada näiteks pindalalise või lineaarse kasvu mõõtmise, sest suure proovialade ja isendite arvu juures on need meetodid liialt aeganõudvad. Kui aga uuritakse näiteks metsaraie mõju säilikpuudel kasvavate samblike konditsioonile, sobib kasutada ka laborimeetodit. Mikroskopeerimine vajab vähe proovimaterjali ja osutaks antud näite puhul võimalikele vetikarakkude kahjustustele ja ülemise koorkihi paksenemisele kaitseks kuivuse ja liigvalguse eest. Järelikult ei saa ka metsasamblike seisundi hindamisel esile tõsta universaalset meetodit, mida alati ülejäänutele eelistada.

KOKKUVÕTE

Samblikud on tundlikud sümbiontsed organismid, kes on hästi tuntud indikaatorid keskkonnaseisundi hindamisel bioindikatsioonis. Looduskaitsebioloogilistes töodes ning füsioloogilistes uuringutes on aga oluline ka samblike endi vitaalsuse hindamine. Kuid samblike seisundi hindamise meetodika on liialt konservatiivne ja keskendunud pigem seostele inimõhu, mitte looduslike tingimustega.

Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida tuntumaid samblike seisundi hindamise meetodeid ja leida neist sobivaimad eelkõige metsasamblike uurimiseks. Sellele eesmärgile tuginedes on sobiva meetodi omadusteks universaalsus, täpsus, mittedestruktiivsus, sobivus välitingimustesse ja optimaalne kulukus. Töö tulemusena selgus, et nendele kriteeriumitele vastavad kõige paremini klorofüllü fluorestsentsi mõõtmine (näitab fotobiondi fotosünteesi intensiivsust), talluse anomaaliate ja anatoomiliste tunnuste vaatlemine, paljunemisstruktuuride ohtruse hindamine ja kasvu ning katvuse määramine (näitavad sambliku kui terviku seisundit).

Ühtki samblike konditsiooni hindamise meetodit ei saagi pidada igas olukorras ideaalseks. Seetõttu on valiku tegemisel oluline konkreetse uuringu eesmärk ja ülesehitus, mis määravad kriteeriumite kaalu. Metsasamblikke uurides ei tohiks üle tähtsustada meetodi sobivust välitingimustesse, vaid võimalusel arvestada ka destruktiivsete laborimeetoditega, mis on enamasti erinevatel kasvuvormidel üheselt rakendatavad ja võimaldavad paremini võrrelda sarnase konditsiooniga tallusi.

METHODS FOR ESTIMATING THE CONDITION OF FOREST LICHENS

KADI TÜRK

SUMMARY

Lichens are sensitive symbiotic organisms, which are well known biomonitors. Their response to environmental change can be used as indicator for many complex factors, from the air pollution to climatic change. There are many cases in which monitoring the condition of lichens themselves is a worthy aim in itself. Measuring the vitality of lichens is important in studies concerning lichen physiology and conservation biology. However, methodology for estimating the condition of lichens is too conservative and focused on anthropogenic rather than ecological factors.

The goal of this paper was to analyze methods for assessment of the vitality of lichens and find the most applicable ones to measure the condition of forest lichens. Based on that, the appropriate method is universal, accurate, non-destructive, suitable for fieldwork and cost-effective. Most appropriate methods were found to be chlorophyll fluorescence measurement, microscopy, observation of morphological abnormalities and the evaluation of growth, coverage and abundance of reproductive structures.

Chlorophyll fluorescence measurement is a non-destructive method for evaluation of the photosynthetic activity. Therefore, it only indicates the condition of photobiont. Observation of morphological abnormalities, evaluation of growth and coverage are also suitable for fieldwork and additionally describe the condition of both symbionts. But these methods are vastly inaccurate and cannot be unambiguously appropriate to different growth forms. These terms are satisfied by microscopy, which is a destructive method.

Since there is no perfect method for lichen condition estimation, the exact methodology should be chosen considering the goals and structure of the study. However, concerning the condition of forest lichens, non-destructive methods should not be overpraised. Laboratory methods – although destructive – have proven to be adequate for different growth forms. These methods are also capable of comparison of thalli with similar condition.

TÄNUSÕNAD

Hindamatu abi eest töö valmimisel tänan eelkõige juhendajat Piret Lõhmust, kes vaatamata kiirele kevadperioodile varustas mu üllitist põhjalike kommentaaridega, jättes siiski ka piisavalt vabadust. Suur tänu ka Asko Lõhmusele suurepärase kirjutamistingimuste võimaldamise ja innustavate manitsuste eest. Abiks oli ka Pille Mänd, kes Piretit täiendades kommenteeris fotosünteesi käsitlevat peatükki.

Mainimata ei saa jätta ka Kaja, kes vaatas mu töö läbi filoloogi pilguga ega heitunud raskepärasest erialasest sõnavarast. Kõige mitmekülgsemat abi pakkus mulle Tanel, kes päästis töö esimese poole läbipõlenud kõvakettalt, õpetas mind Accessi kasutama, julgustas rakendama tekstiredaktorite võõristust tekitavaid funktsioone ja aitas inglise keelega.

Aitäh!

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996.** Class Ascomycetes. Filamentous Ascomycetes with Apothecia - Discomycetes. In: Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (eds). *Introductory mycology*. New York, USA: John Wiley & Sons INC, 376-432.
- Apel K, Hirt H. 2004.** Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.
- Armstrong RA. 1973.** Seasonal growth and growth rate-colony size relationships in six species of saxicolous lichens. *New Phytologist* **72**: 1023-1030.
- Armstrong RA. 1974.** Growth phases in the life of a lichen thallus. *New Phytologist* **73**: 913-918.
- Armstrong RA. 2002.** The effect of rock surface aspect on growth, size structure and competition in the lichen *Rhizocarpon geographicum*. *Environmental and Experimental Botany* **48**: 187-194.
- Armstrong RA. 2005a.** Growth curves of four crustose lichens. *Symbiosis* **38**: 47-57.
- Armstrong RA. 2005b.** Radial Growth of *Rhizocarpon* Section *Rhizocarpon* Lichen thalli over six years at Snoqualmie Pass in the Cascade Range, Washington State. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **37**: 411-415.
- Armstrong RA, Smith SN. 1996.** Do the lichens *Xanthoparmelia conspersa* (Ach.) Hale and *Rhizocarpon* Ram. em. Th. Fr. subgenus *Rhizocarpon* utilise exogenous carbohydrates for radial growth? *Environmental and Experimental Botany* **36**: 13-20.
- Armstrong RA, Smith SN. 1998.** Does radial growth of the lichen *Parmelia conspersa* depend exclusively on growth process at the lobe tip? *Environmental and Experimental Botany* **39**: 263-269.
- Asta J, Erhardt W, Ferretti M, Fornasier F, Kirschbaum U, Nimis PL, Purvis OW, Pirintsos S, Scheidegger C, van Haluwyn C, Wirth V. 2002.** Mapping Lichen Diversity as an Indicator of environmental Quality. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 273-279.
- Bačkor M, Fahselt D. 2003.** Effects of Acidity on Some Physiological Parameters of Laboratory Re-Synthesized Lichen *Cladonia cristatella* and Its Isolated Mycobiont. *The Bryologist* **106(4)**: 583-587.
- Bando M, Sugino M. 1995.** Effect of low-humidity treatment on growth of the lichen *Parmotrema tinctorum* in a growth cabinet. *Journal of Plant Research* **108(1092)**: 527-529.
- Bargagli R, Mikhailova I. 2002.** Accumulation of inorganic contaminants. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 65-84.
- Beckett RP, Mayaba N, Minibayeva FV, Alyabyev AJ. 2005.** Hardening by Partial Dehydration and ABA Increase Desiccation Tolerance in the Cyanobacterial Lichen *Peltigera polydactylon*. *Annals of Botany* **96**: 109-115.
- Beekley PK, Hoffmann GR. 1981.** Effects of Sulphur Dioxide Fumigation on Photosynthesis, Respiration, and Chlorophyll Content on Selected Lichens. *The Bryologist* **84(3)**: 379-390.
- Bennett J. P. 2002.** Algal Layer Ratios as Indicators of Air Pollutant Effects in *Parmelia sulcata*. *The Bryologist* **105(1)**: 104-110.
- Bertsch A. 1966.** Über den CO₂-gaswechsel einiger Flechten nach Wasserdampfaufnahme. *Planta* **68**: 157-166.
- Bjerke JW, Zielke M, Solheim B. 2003.** Long-term impacts of stimulated climatic change on secondary metabolism, thallus structure and nitrogen fixation activity in two cyanolichens from the Arctic. *New Phytologist* **159**: 361-367.

- Björkman O, Demmig-Adams B. 1995.** Regulation of Photosynthetic Light Energy Capture, Conversion, and Dissipation in Leaves of Higher Plants. In: Schulze ED, Caldwell MM (eds.). *Ecophysiology of Photosynthesis*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 17-47.
- Boonpragob K. 2002.** Monitoring physiological change in lichens: total chlorophyll content and chlorophyll degradation. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 323-326.
- Boucher VL, Nash TH. 1990.** Growth patterns in *Ramalina menziesii* in California: coastal vs. inland populations. *The Bryologist* **93**(3): 295-302.
- Brown, DH. 1980.** Notes on the instability of extracted chlorophyll and a reported effect of ozone on lichen algae. *Lichenologist* **12**: 151-154.
- Buffoni-Hall RS, Paulsson M, Duncan K, Tobin AK, Widell S, Bornman JF. 2003.** Water- and temperature-dependence of DNA damage and repair in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *mitis* exposed to UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* **118**: 371-379.
- Büdel B, Scheidegger C. 1996.** Thallus morphology and anatomy. In: Nash TH III (ed). *Lichen biology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 37-64.
- Calatayud A, Deltoro VI, Abadia A, Abadia J, Barreno E. 1999.** Effects of ascorbate feeding on chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle components in the lichen *Parmelia quercina* (Willd.) Vainio exposed to atmospheric pollutants. *Physiologia Plantarum* **105**: 679-684.
- Calatayud A, Sanz MJ, Calvo E, Barreno E, del Valle-Tascon S. 1996.** Chlorophyll a fluorescence and chlorophyll content in *Parmelia quercina* thalli from a polluted region of northern Castellón (Spain). *Lichenologist* **28**(1): 49-65
- Caldiz MS. 2004.** Seasonal growth pattern in the lichen *Pseudocyphellaria berberina* in north-western Patagonia. *Lichenologist* **36**(6): 435-444.
- Calkin PE, Eillis JM. 1980.** A lichenometric dating curve and its application to Holocene glacier studies in the central Brooks Range, Alaska. *Arctic and Alpine Research* **12**: 245-264.
- Cameron RP. 2002.** Habitat associations of epiphytic lichens in managed and unmanaged forest stands in Nova Scotia. *Northeastern naturalist* **9**(1): 27-46.
- Chakir S, Jensen M. 1999.** How does *Lobaria pulmonaria* regulate photosystem II during progressive desiccation and osmotic water stress? A chlorophyll fluorescence study at room temperature and at 77 K. *Physiologia Plantarum* **105**: 257-265.
- Coxson DS, Coyle M. 2003.** Niche partitioning and photosynthetic response of alecatorioid lichens from subalpine spruce-fir forest in natural north-central British Columbia, Canada: the role of canopy microclimate gradients. *Lichenologist* **35**(2): 157-175.
- Cunty D, Pignata ML, Kranner I, Beckett R. 2002.** Biomarkers of pollution-induced oxidative stress and membrane damage in lichens. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 97-110.
- Dahlman L. 2003.** Resource acquisition and allocation in Lichens. PhD-thesis, Department of Ecology and Environmental Science, Umeå University, Umeå, Sweden.
- Dahlman L, Palmqvist K. 2003.** Growth of two foliose tripartite lichens, *Nephroma arcticum* and *Peltigera aphthosa*: empirical modelling of external vs internal factors. *Functional Ecology* **17**: 821-831.
- Dahlman L, Persson J, Näsholm T, Palmqvist K. 2003.** Carbon and nitrogen distribution in the green algal lichens *Hypogymnia physodes* & *Platismatia glauca* in relation to nutrient supply. *Planta* **217**: 41-48.

- de los Rios A, Wierzechos J, Sancho LG, Ascaso C. 2004.** Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* **50(3)**: 143-152.
- Deltero VI, Gimeno C, Calatayud A, Barreno E. 1999.** Effects of SO₂ fumigations on photosynthetic CO₂ gas exchange, chlorophyll a fluorescence emission and antioxidant enzymes in the lichens *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea*. *Physiologia Plantarum* **105**: 648-654.
- Dietz S, Hartung W. 1998.** Abscissic acid in lichens: variation, water relations and metabolism. *New Phytologist* **138**: 99-106.
- Dietz S, Hartung W. 1999.** The effect of abscissic acid on chlorophyll fluorescence in lichens under extreme water regimes. *New Phytologist* **143**: 495-501.
- Dyer PS. 2002.** Hydrophobins in the lichen symbiosis. *New Phytologist* **154(1)**: 1-4.
- Esseen PA, Renhorn KE. 1997.** Edge effects on a pendulous epiphytic lichen in fragmented forests. In: Renhorn KE. Effects of forestry on biomass and growth of epiphytic macrolichens in boreal forests. PhD-thesis, Department of Ecological Botany, Umeå University, Umeå, Sweden: paper V.
- Esseen PA, Renhorn KE. 1998.** Edge effects on an Epiphytic Lichen in Fragmented Forests. *Conservation Biology* **12/6**: 1307-1317.
- Eversman S. 1978.** Effects of low-level SO₂ on *Usnea hirta* and *Parmelia chlorochroa*. *The Bryologist* **81**: 368-377.
- Eversman S, Sigal L. 1984.** Ultrastructural Effects of Peroxyacetyl Nitrate (PAN) on Two Lichen Species. *The Bryologist* **27(2)**: 112-118.
- Fahselt D. 1996.** Individuals, populations and population ecology. In: Nash TH III (ed). *Lichen biology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 181-198.
- Fahselt D, Krol M, Alstrup V, Hüner N. 2001.** Detection of Pigments in Specimens of Recent and Subfossil *Umbilicaria* from North Greenland. *The Bryologist* **104(4)**: 593-599
- Ferretti, M ja Erhardt, W. 2002.** Key issues in designing Biomonitoring programmes. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 111-139.
- Fortin MJ, Dale M. 2005.** Spatio-temporal analysis. In: *Spatial analysis. A Guide for Ecologists*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 256-316.
- Gaio-Oliveira G, Dahlman L, Maguas C, Palmqvist K. 2004a.** Growth in relation to microclimatic conditions and physiological characteristics of four *Lobaria pulmonaria* populations in two contrasting habitats. *Ecography* **27**: 13-28.
- Gaio-Oliveira G, Dahlman L, Palmqvist K, Maguas C. 2004b.** Ammonium uptake in the nitrophytic lichen *Xanthoria parietina* and its effects on vitality and balance between symbionts. *The Lichenologist* **36(1)**: 75-86.
- Garty J, Kloog N, Wolfson R, Cohen Y, Karnieli A, Avni A. 1997.** The influence of air pollution on the concentration of mineral elements, on the spectral reflectance response and on the production of stress-ethylene in the lichen *Ramalina duraei*. *New Phytologist* **137**: 587-597.
- Garty J, Kunin P, Delarea J, Weiner S. 2002a.** Calcium oxalate and sulphate-containing structures on the thallial surface of the lichen *Ramalina lacera*: response to polluted air and simulated acid rain. *Plant, Cell and Environment* **25(12)**: 1591-1604.
- Garty J, Levin T, Cohen Y, Lehr H. 2002b.** Biomonitoring air pollution with the desert lichen *Ramalina maciformis*. *Physiologia Plantarum* **115**: 267-275
- Garty J, Tomer S, Levin T, Lehr H. 2003.** Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel. *Environmental Research* **91**: 186-198.
- Garty J, Weissman L, Tamir O, Beer S, Cohen Y, Karnieli A, Orlovsky L. 2000.** Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiologia Plantarum* **109**: 410-418.

- Gauslaa Y, Kopperud C, Solhaug KA. 1996.** Optimal quantum yield of photosystem II and chlorophyll degradation of *Lobaria pulmonaria* in relation to pH. *Lichenologist* **28**(3): 267-278
- Gauslaa Y, Solhaug KA. 2000.** High-light-intensity damage to the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* within a natural forest: the applicability of chlorophyll fluorescence methods. *Lichenologist* **32**(3): 271-289.
- Gilbert OL. 1971.** Studies along the edge of a lichen desert. *Lichenologist* **5**: 11-17.
- Gilbert OL. 2002.** A transplant operation involving *Lobaria amplissima*: The first twenty years. *Lichenologist* **34**: 267-272.
- Gonzalez L. 2001.** Determination of photosynthetic pigments. In: Roger MJR (ed). *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 97-111.
- Green TGA, Lange OL. 1995.** Photosynthesis in Poikilohydric Plants: A Comparison of Lichens and Bryophytes. In: Schulze ED, Caldwell MM (eds.). *Ecophysiology of Photosynthesis*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 319-341.
- Gries C. 1996.** Lichens as indicators of air pollution. In: Nash TH III (ed). *Lichen biology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 240-254.
- Hauck M. 2003.** Epiphytic Lichen Diversity and Forest Dieback: The Role of Chemical Site Factors. *The Bryologist* **106**(2): 257-269.
- Heidmarsson S. 1998.** Species delimitation in four long-spored species of *Dermatocarpon* in the Nordic countries. *Annales Botanici Fennici* **35**: 59-70.
- Hill DJ. 1981.** The growth of lichens with special reference to the modelling of circular thalli. *Lichenologist* **13**: 265-287.
- Hill DJ. 2002.** Measurement of Lichen Growth. In: Kranner I, Beckett RP, Varma AK (eds). 2002. *Protocols in Lichenology*. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 255-278.
- Hilmo O, Holien H. 2002.** Epiphytic Lichen Response to the Edge Environment in a Boreal *Picea abies* Forest in Central Norway. *The Bryologist* **105**: 48-56.
- Holopainen T, Kauppi M. 1989.** A comparison of light, fluorescence and electron microscopic observations in assessing the SO₂ injury of lichens under different moisture conditions. *Lichenologist* **21**(2): 119-134.
- Honegger R. 1996.** Morphogenesis. In: Nash TH III (ed). *Lichen biology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 65-87.
- Honegger R, Conconi S, Kutasi V. 1996.** Field studies on growth and regenerative capacity in the foliose macrolichen *Xanthoria parietina* (Teloschistales, Ascomycotina). *Botanica Acta* **109**: 187-193.
- Hyvärinen M. 1992.** Adaptivity of the thallus structure of *Hypogymnia physodes* to microclimatic conditions. *Lichenologist* **24**(3): 267-279.
- Hyvärinen M, Crittenden PD. 1998.** Growth of the cushion-forming lichen, *Cladonia porentosa*, at nitrogen-polluted and unpolluted heathland sites. *Environmental and Experimental Botany* **40**: 67-76.
- Hyvärinen M, Walter B, Koopmann R. 2002.** Secondary metabolites in *Cladonia stellaris* in relation to reindeer grazing and thallus nutrient content. *Oikos* **96**: 273-280.
- Inсарov G. 2002.** A Method for detecting large-scale environmental Change with Lichens. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 399-403.
- Inсарov G, Schroeter B. 2002.** Lichen Monitoring and Climate Change. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 183-201.
- Jensen M. 2002.** Measurement of Chlorophyll Fluorescence in Lichens. In: Kranner, I, Beckett RP, Varma AK (eds.). *Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 135-151.

- Jensen M, Feige GB. 1987.** The effect of desiccation and light on the 77 K chlorophyll fluorescence properties of the lichen *Peltigera aphthosa*. In: E. Peveling (ed.). *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties*. Berlin-Stuttgart, Germany: Bibliotheca Lichenologica **25**: 325-330.
- Jensen M, Kricke R. 2002.** Chlorophyll fluorescence measurements in the field: assessment of the vitality of large number of lichen thalli. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 327-332.
- Johansson P, Ehrlen J. 2003.** Influence of habitat quantity, quality and isolation on distribution and abundance of two epiphytic lichens. *Journal of Ecology* **91**: 213-221.
- Jumelle H. 1891.** Influence de l'humidité sur les échanges gazeux entre les lichens et l'atmosphère. *Assoc. franc. Pour l'avancement des Sciences, Compt. Rend.* 20: 484-488.
- Kranner I. 2002.** Glutathione status correlates with different degrees of desiccation tolerance in three lichens. *New Phytologist* **154**: 451-460.
- Kranner I, Beckett RP, Varma AK (eds). 2002.** *Protocols in Lichenology*. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer Verlag
- Kranner I, Zorn M, Turk B, Wornik S, Beckett RP, Batič F. 2003.** Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytologist* **160**: 167-176.
- Kricke R, Loppi S. 2002.** Bioindication: the IAP approach. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 21-37.
- Laisk A, Eichelmann H. 2001.** Klorofüllü fluorestsents kui fotosüsteem II (PSII) töökiiruse näitaja. In: Padu E, Eichelmann H. *Taimefüsioloogia praktikum*. Tartu, Estonia: Atlex, 37-41.
- Lange OL. 1965.** Der CO₂-gaswechsel von Flechten nach Erwärmung im feuchten Zustand. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **78**: 441-454
- Lange OL. 1969.** Experimentell-okologische Untersuchungen an Flechten der Negev-Wüste. I. CO₂-gaswechsel von *Ramalina maciformis* (Del.) Bory unter kontrollierten Bedingungen im Laboratorium. *Flora, Abt. B* **158**: 324-359.
- Larcher W, Vareschi V. 1988.** Variation in morphology and functional traits of *Dictyonema glabratum* from contrasting habitats in the Venezuelan Andes. *Lichenologist* **20**(3): 269-277.
- Larson DW. 1981.** Differential Wetting in Some Lichens and Mosses: The Role of Morphology. *The Bryologist* **84**(1): 1-15.
- Masing V (ed). 1992.** *Ökoloogialeksikon*. Tallinn, Estonia: Eesti Entsüklopeediakirjastus
- McCarthy DP. 1997.** Habitat selection and ecology of *Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr. In glacier forefields: implications for lichenometry. *Journal of Biogeography* **24**: 363-373.
- McCune B. 2000.** Lichen Communities as Indicators of Forest Health. *The Bryologist* **103**(2): 353-356.
- McCune B, Derr CC, Muir PS, Shirazi A, Sillett SC, Daly WJ. 1996.** Lichen pendants for transplant and growth experiments. *The Lichenologist* **28**: 161-169.
- McCune B, Dey J, Peck J, Heiman K, Will-Wolf S. 1997.** Regional Gradients in Lichen Communities of the Southeast United States. *The Bryologist* **100**(2): 145-158.
- McCune B, Lesica P. 1992.** The trade-off between species capture and quantitative accuracy in ecological inventory of lichens and bryophytes in forests in Montana. *The Bryologist* **95**(3): 296-304.
- Miidla H. 1984a.** Regulaatorained. In: Miidla, H. *Taimefüsioloogia*. Tallinn, Estonia: Valgus, 287-327.
- Miidla H. 1984b.** Taimeraku struktuur. In: Miidla, H. *Taimefüsioloogia*. Tallinn, Estonia: Valgus, 55-81.

- Minibayeva F, Beckett RP. 2001.** High rates of extracellular superoxide production in bryophytes and lichens, and an oxidative burst in response to rehydration following desiccation. *New Phytologist* **152**: 333-341.
- Monte M. 1993.** The influence of environmental conditions on the reproduction and distribution of epilithic lichens. *Aerobiologia* **9**: 169-179.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2005.** Microscopic Principles and Applications. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. Philadelphia, USA: Elsevier Mosby: 171-175.
- Nash TH III. 1996a.** Introduction. In: Nash TH III (ed). *Lichen biology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1-7.
- Nash TH III. 1996b.** Photosynthesis, respiration, productivity and growth. In: Nash TH III (ed). *Lichen biology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 88-120.
- Nash TH III, Sigal L. 1981.** Ecological approaches to use of lichenized fungi as indicators of air pollution. In: D. T. Wicklow & G. C. Carroll (eds.): *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. New York, USA, Marcel Dekker: 481-497.
- Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). 2002a.** *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA. 2002b.** Monitoring with lichens – monitoring lichens. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1-4.
- Ott S. 2002.** Analysis of Ethylene and ACC in Lichens. In: Kranner, I, Beckett RP, Varma AK (eds.). *Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 182-195.
- Ott S, Sancho LG. 1993.** Morphology and anatomy of *Caloplaca coralligera* (Teloschistaceae) as an adaption to extreme environmental conditions in maritime Antarctic. *Plant Systematics and Evolution* **185**: 123-132.
- Padu E. 2001.** Fluorestseeruvad ühendid taimedes. In: Padu E, Eichelmann H. *Taimefüsioloogia praktikum*. Tartu, Estonia: Atlex: 15-26.
- Palmqvist K. 2000.** Carbon economy in lichens. *New Phytologist* **148**: 11-36.
- Palmqvist K, Dahlman L, Valladares F, Tehler A, Sancho LG, Mattsson JE. 2002.** CO₂ exchange and thallus nitrogen associations from different climate zones. *Oecologia* **133**: 295-306.
- Palmqvist K, de los Rios A, Ascaso C, Samuelsson G. 1997.** Photosynthetic carbon acquisition in the lichen photobionts *Coccomyxa* and *Trebouxia* (Chlorophyta). *Physiologia Plantarum* **101**: 67-76.
- Palmqvist K, Sundberg B. 2000.** Light use efficiency of dry matter gain in five macro-lichens: relative impact of microclimate and species-specific traits. *Plant, Cell & Environment* **23**: 1-14.
- Pentecost A, Rose CI. 1985.** Apothecium production in *Xanthoria parietina*. *Lichenologist* **17(1)**: 33-38.
- Price K, Hochachka G. 2000.** Epiphytic Lichen Abundance: effects of stand age and composition in coastal British Columbia. *Ecological Applications* **11(3)**: 904-913.
- Purvis OW, Williamson BJ, Bartok K, Zoltani N. 2000.** Bioaccumulation of lead by the lichen *Acarospora smaragdula* from smelter emissions. *New Phytologist* **147**: 591-599.
- Randlane T, Saag A. 2004.** Oskussõnade seletus. In: Randlane T, Saag A (eds). *Eesti pisisamblikud*. Tartu, Estonia: Tartu University Press, 44-63.
- Renhorn, K-E. 1997.** Effects of forestry on biomass and growth of epiphytic macrolichens in boreal forests. PhD-thesis, Department of Ecological Botany, Umeå University, Umeå, Sweden.
- Renhorn KE, Esseen PA, Palmqvist K, Sundberg B. 1997.** Growth and vitality of epiphytic lichens I. Responses to microclimate along a forest edge-interior gradient. *Oecologia* **109**: 1-9.

- Rheault H, Drapeau P, Bergeron Y, Esseen PA. 2003.** Edge effects on epiphytic lichens in managed black spruce forests of eastern North America. *Canadian Journal of Forest Research* **33**: 23-32.
- Richardson DHS. 1987.** Lichens as pollution indicators in Ireland. In: Richardson DHS (ed.). *Biological Indicators of Pollution*. Dublin, Ireland: Royal Irish Academy, 155-168.
- Richardson DHS, Cameron RP. 2004.** Cyanolichens: their response to pollution and possible management strategies for their conservation in northeastern North America. *Northeastern Naturalist* **11(1)**: 1-22.
- Rikkinen J. 1997.** Habitat shifts and morphological variation of *Pseudevernia furfuracea* along a topographical gradient. In: Tibell L, Hedberg I (eds.). *Lichen Studies: Dedicated to Rolf Santesson*. Uppsala, Sweden: Symbolae Botanicae Upsalienses 32:1, Acta Universitatis Upsaliensis, Gotab, 223-245.
- Roger MJR, Weiss O. 2001.** Fluorescence Techniques. In: Roger MJR (ed). *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 155-171.
- Scheidegger C, Goward T. 2002.** Monitoring Lichens for Conservation: Red Lists and Conservation Action Plans. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 163-181.
- Schipperges B, Kappen L, Sonesson M. 1995.** Intraspecific variations of morphology and physiology of temperate to arctic populations of *Cetraria nivalis*. *Lichenologist* **27(6)**: 517-529.
- Schlensog M, Schroeter B. 2001.** A new method for accurate *in situ* monitoring of chlorophyll a fluorescence in lichens and bryophytes. *Lichenologist* **33(5)**: 443-452.
- Schnittler M, Stephenson SL. 2000.** Myxomycete biodiversity in four different forest types in Costa Rica. *Mycologia* **92(4)**: 626-637.
- Schofield SC, Campbell DA, Funk C, MacKenzie TDB. 2003.** Changes in macromolecular allocation in nondividing algal symbionts allow for photosynthetic acclimation in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytologist* **159**: 709-718.
- Schulze ED, Lange OL. 1968.** CO₂-gaswechsel der Flechte *Hypogymnia physodes* bei tiefen Temperaturen im Freiland. *Flora, Abt. B* **158**: 180-184.
- Scott MG, Hutchinson TC. 1987.** Effects of a simulated acid rain episode on photosynthesis and recovery in the caribou-forage lichens, *Cladina stellaris* (Opiz) Brodo and *Cladina rangiferina* (L.) Wigg. *New Phytologist* **107(3)**: 567-575.
- Sigal LL, Nash TH III. 1983.** Lichen communities on conifers in Southern California mountains: an ecological survey relative to oxidant air pollution. *Ecology* **64(6)**: 1343-1354.
- Sigal LL, Taylor OC. 1979.** Preliminary studies of the gross photosynthetic response of lichens to peroxyacetylnitrite fumigations. *The Bryologist* **82**: 564-575.
- Smith RIL. 1995.** Colonization by lichens and the development of lichen-dominated communities in the maritime Antarctic. *Lichenologist* **31**: 473-483.
- Spellerberg IF. 2005.** Biological indicators and indices. In: *Monitoring Ecological Change*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 152-190.
- Smith VR, Gremmen NJM. 2001.** Photosynthesis in a sub-Antarctic shore-zone lichen. *New Phytologist* **149**: 291-299.
- Sundberg B, Näsholm T, Palmqvist K. 2001.** The effect of nitrogen on growth and key thallus components in the two tripartite lichens, *Nephroma arcticum* and *Peltigera aphthosa*. *Plant, Cell and Environment* **24**: 517-527.
- Zobel K. 1988.** Use of epiphytic lichens as bioindicators of atmospheric pollution in the Khamar-Daban Mountains (Lake Baikal region). *Acta et Commentationes Universitatis Tartuensis* **812**: 47-66.

- Tamayo PR, Weiss O, Sanchez-Moreias AM. 2001.** Gas exchange techniques in photosynthesis and respiration. Infrared Gas Analyser. In: Roger MJR (ed). *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 113-139.
- Tarhanen S. 1998.** Ultrastructural Responses of the Lichen *Bryoria fuscescens* to Simulated Acid Rain and Heavy Metal Deposition. *Annals of Botany* **82(6)**: 735-746.
- Tarhanen S, Holopainen T, Oksanen J. 1997.** Ultrastructural Changes and Electrolyte Leakage from Ozone Fumigated Epiphytic Lichens. *Annals of Botany* **80(5)**: 611-621.
- Tarhanen S, Poikolainen J, Holopainen T, Oksanen J. 2000.** Severe photobiont injuries of lichens are strongly associated with air pollution. *New Phytologist* **147**: 579-590.
- Thomas MA. 2002.** Measuring Activities of the Enzymes Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase in Lichens. In: Kranner, I, Beckett RP, Varma AK (eds.). *Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 196-211.
- Tohver A. 1977.** Elektronide transpordiahela variandid. In: *Üldine Biokeemia*. Tallinn, Estonia: Valgus, 482-488.
- Trass H. 1973.** Lichen sensitivity to the air pollution and index of poleotolerance (I.P.). *Folia Cryptogamica Estonica* **3**: 19-22.
- Trembley ML, Ringli C, Honegger R. 2002.** Differential expression of hydrophobins *DGH1*, *DGH2* and *DGH3* and immunolocalization of *DGH1* in strata of the lichenized basidiocarp of *Dictyonema glabratum*. *New Phytologist* **154(1)**: 185-195.
- Tretiach M, Carpanelli A. 1992.** Chlorophyll content and morphology as factors influencing the photosynthetic rate of *Parmelia caperata*. *Lichenologist* **24(1)**: 81-90.
- van Haluwyn C, van Herk CM. 2002.** Bioindication: the common approach. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 39-64.
- Vrablikova H, McEvoy M, Solhaug KA, Bartak M, Gauslaa Y. 2006.** Annual variation in photoacclimation and photoprotection of the photobiont in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **83**: 151-162.
- Weissman L, Garty J, Hochman A. 2005.** Characterization of Enzymatic Antioxidants in the Lichen *Ramalina lacera* and Their Response to Rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* **71(11)**: 6508-6514.
- Werner A. 1993.** Aktives Biomonitoring mit der Flechte *Hypogymnia physodes* zur Ermittlung der Luftqualität in Hannover. *Bibliotheca Lichenologica* **49**: 113.
- Will-Wolf S, Esseen PA, Neitlich P. 2002a.** Monitoring Biodiversity and Ecosystem Function: Forests. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with lichens – monitoring lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 203-222.
- Will-Wolf S, Hawksworth DL, McCune B, Rosentreter R, Sipman HJM. 2004.** Lichenized Fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds.): *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, Academic Press, 173-195.
- Will-Wolf S, Scheidegger C, McCune B. 2002b.** Methods for monitoring Biodiversity and Ecosystem Function. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (eds). *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 147-161.